

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Descripción numérica de la cinemática del proceso de lisis de  
bacterias por fagos : comprobación experimental para el  
caso de la bacteria E. coli C600 y el fago [Landa]cI**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Rosa de Vidania Muñoz**

DIRECTOR:

**Fernando Garcés Toledano**

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

MADRID 1982

**DESCRIPCION NUMERICA DE LA CINEMATICA  
DEL PROCESO DE LISIS DE BACTERIAS POR  
FAGOS. COMPROBACION EXPERIMENTAL PARA  
EL CASO DE LA BACTERIA E. coli C<sub>600</sub> Y EL  
FAGO  $\lambda_{CI}$  .**



R. 26.417

**Memoria presentada por Rosa de  
Vidania Muñoz para optar al gra-  
do de Doctor en Ciencias Biológi-  
cas y dirigida por el Dr. Fernando  
Garcés Toledano.**

DESCRIPCION NUMERICA DE LA CINEMATICA DEL PROCESO DE LISIS  
DE BACTERIAS POR FAGOS. COMPROBACION EXPERIMENTAL PARA EL  
CASO DE LA BACTERIA E.coli C<sub>600</sub> Y EL FAGO  $\lambda$  CI.

Memoria presentada por Rosa de  
Vidania Muñoz para optar al gra  
do de Doctor en Ciencias Bioló-  
gicas y dirigida por el Dr. Fer  
nando Garcés Toledano.

U.B.

*Fernando Garcés*

*Rosa de Vidania*

Deseo expresar mi agradecimiento a las personas que han contribuido a que la realización y presentación del trabajo objeto de esta Memoria fuera posible.

En primer lugar a la Dra. M.A. Vigón su acogida en la División de Investigación Básica de la Junta de Energía Nuclear y el apoyo que de ella - he recibido, así como su atenta corrección del manuscrito.

Al Instituto de Estudios Nucleares la ayuda económica prestada.

Al Prof. A.M. Municio el haber aceptado la presentación de esta Memoria.

Al Dr. C.A. Dávila el que aceptara mi estancia en la Sección de Biofísica de la División de Investigación Básica y especialmente sus consejos y ayuda.

Al Dr. F. Garcés no sólo la dirección de este trabajo sino su atención y ayuda continuas.

A todos los componentes de la Sección de Biofísica la amabilidad de su acogida, que ha contribuido a hacer mi estancia más agradable.

Puesto que para la realización de este trabajo ha sido necesaria la colaboración de investigadores de la Sección de Altas Energías de la División de Investigación Básica de la J.E.N., para todos ellos y para su personal no investigador mi especial agradecimiento por su interés en un trabajo que a la postre no está relacionado con su especialidad. Especialmente a los doctores J.M.Salicio, J.A. Garzón y J. Salicio.

Al Dr. J.A. Rubio le debo no sólo su directa participación en las cuestiones teóricas del trabajo, sin la cual éste no hubiera podido realizarse, sino su ayuda continua y el que pusiera a mi disposición los equipos de la Sección de Altas Energías cuya utilización he necesitado.

Finalmente quiero agradecer a la División del Centro de Cálculo de la J.E.N. su colaboración y al Servicio de Delineación de la División de Investigación Básica el trabajo realizado.

# INDICE

	<u>Página</u>
CAPITULO I. INTRODUCCION .....	1
I.1 Introducción general .....	1
I.2 El fago Lambda. Generalidades .....	5
I.3 Los procesos de adsorción e inyección .....	8
I.4 Funciones de los genes clear .....	10
I.5 El ciclo lítico del fago Lambda .....	13
CAPITULO II. METODOS EXPERIMENTALES .....	16
II.1 Introducción .....	16
II.2 Estirpes microbiológicas utilizadas .....	16
II.3 Medios de crecimiento y lisis .....	17
II.4 Condiciones de cultivo .....	18
II.5 Evaluación del crecimiento bacteriano .....	18
II.6 Preparación de stocks de fagos y bacterias .....	20
II.7 Método de contaje de fagos .....	21
II.8 Determinaciones del número de fagos libres en los procesos de aproximación .....	22
II.9 Preparación y calibración del suero anti $\lambda_c$ .....	24
II.10 Medida del tiempo de generación del fago (período latente) y del tamaño de la explosión bacteriana ....	26
Notas a pié de página .....	29
Descripción de tablas .....	30
Tablas .....	31
Descripción de figuras .....	33
Figuras .....	34

DE CALCULO DEL MODELO .....	36
III.1 Introduccion .....	36
III.2 Descripcion de la evolucion de un cultivo bacte- riano en ausencia de fagos. Formulacion a partir de la medida de densidades opticas .....	38
III.2.1 Curva de crecimiento bacteriano. Para- metrizaciones .....	39
III.3 Descripcion del proceso de aproximacion de fagos a bacterias. Hipotesis utilizadas .....	42
III.3.1 Expresion desarrollada para la eficacia de infeccion .....	43
III.4 Descripcion numerica del proceso de lisis bacte- riana por fagos .....	43
III.5 Otras hipotesis consideradas en la descripcion numerica de la lisis .....	53
III.6 Metodos numericos utilizados .....	57
III.6.1 Descripcion de la metodologia de calculo seguida en la subrutina FCN, de usuario, del programa MINUIT .....	60
III.7 Resumen de caracteristicas, parametros y predic- ciones del modelo de lisis .....	61
Notas a pie de pagina .....	65
Descripcion de figuras .....	66
Figuras .....	67
CAPITULO IV. COMPROBACION DE LAS HIPOTESIS FUNDA- MENTALES DEL MODELO .....	69
IV.1 Introduccion .....	69
IV.2 Comprobacion de la parametrizacion propuesta para la curva de crecimiento bacteriano .....	69
IV.2.1 Determinacion del numero de bacterias en un cultivo .....	70
IV.2.2 Evolucion del cultivo bacteriano .....	72

IV.3	Determinación experimental del tiempo de aproximación (Ritmo de adsorción) .....	75
IV.4	Comprobación experimental de la expresión deducida para la eficacia de la infección .....	82
	Notas a pié de página .....	94
	Descripción de tablas .....	95
	Tablas .....	97
	Descripción de figuras .....	106
	Figuras .....	109
	CAPITULO V. RESULTADOS .....	145
V.1	Introducción .....	145
V.2	Presentación y discusión de resultados .....	145
V.2.1	Datos experimentales .....	145
V.2.2	Tipos de ajustes .....	147
V.2.3	Discusión de resultados (Ajustes individuales) .....	149
V.2.4	Discusión de resultados (Ajustes simultáneos a grupos de curvas de lisis de igual momento de infección) .....	152
V.2.5	Discusión de resultados (Ajustes simultáneos a grupos de curvas de lisis de igual multiplicidad de infección) .....	154
V.2.6	Discusión general y comprobación experimental de resultados .....	155
	Descripción de tablas .....	160
	Tablas .....	161
	Descripción de figuras .....	168
	Figuras .....	170
	CAPITULO VI. CONCLUSIONES .....	222
	APENDICE I .....	226
	BIBLIOGRAFIA .....	243

## INTRODUCCION

### I.1 Introducción general

El objetivo del trabajo que se presenta en esta Memoria es el desarrollo de un modelo teórico que permite la interpretación numérica de la cinemática del proceso de lisis bacteriana por fagos de ciclo lítico. Su comprobación experimental se ha realizado utilizando el fago  $\lambda_{cI}$  y la bacteria E.coli C<sub>600</sub>.

A pesar del gran desarrollo alcanzado por la genética molecular en el conocimiento de la estructura y ciclo biológico de los fagos en general y de algunos casos concretos en particular ( $\lambda$ , serie T ...), es escasa la información existente sobre la interpretación cinemática de los procesos de lisis. En la década de los sesenta la elaboración de modelos biológicos interpretativos del comportamiento de poblaciones mixtas fué un tema de trabajo abordado sólo de forma esporádica (Campell 1961), siendo en los últimos años de la presente cuando mayor énfasis se ha puesto en su estudio (Van de Ende 1973, Titman 1976, Chao et al. 1977, Habte y Alexander 1978, Varon y Zieger 1978 y Crowley et al. 1980). Ello es tal vez debido al espectacular progreso experimentado por la Biología y Genética Moleculares y al muy considerable desarrollo de la Informática. Efectivamente, en la interpretación numérica de los procesos de lisis es necesario conocer el comportamiento de la población mixta fago-bacteria y disponer de grandes ordenadores que permitan la puesta en práctica de modelos numéricos. En este último sentido conviene destacar que el trabajo ha sido posible gracias a la existencia en la JEN de un ordenador de gran potencia (UNIVAC 1100/81) y del correspondiente equipo de expertos en Informática.

En relación con los trabajos precedentes que han tratado temas similares conviene destacar que normalmente se han utilizado los microorganismos como material biológico, debido a su rapidez de crecimiento, el reducido espacio ocupado por el imprescindible equipo experimental, la posibilidad de controlar las condiciones ambientales y el poder observar en tiempos relativamente cortos los efectos producidos tras varias generaciones.



ganismos está dedicada al análisis del comportamiento microbiano en cultivo continuo con sustratos limitantes. Debido a ellos (Monod 1950, Herbert 1956, Caperon 1969) ha sido posible la aplicación de los microorganismos - para la producción de antibióticos, proteínas, etc.

Otras aportaciones han estudiado el comportamiento de dos poblaciones compitiendo por un mismo medio sin que entre ellas exista ninguna relación de predación. Por ejemplo, la competencia ecológica entre dos especies de algas diatomeas potencialmente limitadas por el fosfato y silicato presente en las aguas (Titman 1976).

Mayor interés para nosotros ofrecen los estudios del comportamiento - de dos o más poblaciones de microorganismos entre los que se da alguna forma de predación. Entre ellos pueden mencionarse los relativos a bacterias y bacteriofagos (Campell 1971, Chao et al. 1977), protozoos y bacterias - (Van de Ende 1973, Habte y Alexander 1978), bacterias y bacterias predadoras (Afinogenova et al. 1978, Varon y Ziegler 1978), y los estudios realizados en el sistema ecológico formado por bacterias, bacterias predadoras de esas bacterias y bacteriofagos específicos de las bacterias predadoras (Crowley et al. 1980).

El caso más directamente relacionado con el trabajo objeto de la presente Memoria es el de bacterias y bacteriofagos predadores, es decir, bacteriofagos no temperados. Un primer intento de descripción del proceso de infección y lisis de un cultivo de bacterias por bacteriofagos se debe a - Campell que, desde cuestiones generales, expone una revisión de los hechos conocidos hasta entonces sobre las condiciones de existencia de los bacteriofagos. El trabajo aborda también la dinámica de las poblaciones considerando, en uno de los casos, el comportamiento de fagos virulentos en un medio ecológico abierto (cultivo continuo) en el que existe una población de bacterias huéspedes. Para describir el proceso Campell plantea un sistema de ecuaciones diferenciales y aporta su solución para un estado final estacionario, en el que se alcanza un equilibrio entre la concentración de fagos y la de bacterias. Además de no ser éste el caso que pretendemos analizar con nuestra descripción numérica, ya que abordamos el problema en un medio ecológico cerrado, el estudio referido no considera algunos efectos que estimamos de vital importancia, como la posibilidad de que a una bacte

nes experimentales de la descripción propuesta. El trabajo de Campbell es sin embargo un precedente de interés para el análisis numérico que posteriormente se presenta.

En forma general la evolución de una población bacteriana infectada con fagos virulentos, como el  $\lambda_{CI}$ , elegido para tener la seguridad de estar en un proceso en que la relación fago bacteria (*E coli* C<sub>600</sub>) es de tipo lítico (la probabilidad de mutación del fago  $\lambda_{CI}$  a formas lisogénicas es inferior a  $10^{-5}$ ), es la siguiente:

Al añadir los fagos al cultivo bacteriano, creciendo en medio líquido en un sistema cerrado, parte de las bacterias de la población son infectadas. Las no infectadas siguen su proceso normal de duplicación mientras que las infectadas provocan por explosión la presencia de nuevos fagos en el medio, que originaran el comienzo de un nuevo ciclo de infección. El proceso se repetirá mientras queden bacterias susceptibles de ser infectadas, llegando gradualmente a un momento en que el cultivo bacteriano deja de crecer y tras un tiempo acaba por lisar completamente. Una de las motivaciones de nuestro trabajo ha sido la de analizar el rendimiento en fagos de la lisis, dependiendo de las condiciones de momento y multiplicidad, en que se realiza la infección, ya que los bacteriofagos son uno de los materiales de partida para la obtención de DNA y el laboratorio de Biofísica molecular de la JEN ha requerido de su producción a escala preparativa, dadas las características de la experimentación que en él, habitualmente se realiza (estudio de las alteraciones producidas en el DNA por agresión ambiental, radiación  $\gamma$ , ultravioleta, radicales libres, etc.)

El proceso de lisis conducirá a un mayor o menor rendimiento en fagos y será más o menos rápido dependiendo de todos los factores que influyen en él: tiempo de generación bacteriano, tiempo de generación del fago, tamaño de la explosión (número de fagos producidos por cada bacteria infectada), momento y multiplicidad de la infección, número de fagos adsorbidos por bacteria, y el tiempo mas o menos considerable que transcurra desde que los fagos estan presentes en el medio hasta que son adsorbidos a bacterias. Además de estos factores, cuya influencia en el proceso de lisis es indudable, existen otros adicionales que puede pensarse influyan en la evolución de los cultivos infectados. Este es el caso de la posible adsorción de fagos a restos celulares procedentes de las lisis bacterianas, la posible falta de capacidad de infección de parte de los fagos producidos, o el posible despren-

rianas. Todos estos factores han sido divididos en dos grupos para la elaboración de nuestra descripción de la lisis, las variables internas, que vienen definidas para un fago y bacteria concretos por las condiciones en que se realice el cultivo, y las externas, que dependen de las condiciones en que se lleva a cabo la infección, concretamente la concentración de fagos inicial y el momento en que se realiza la infección relativo a la curva de crecimiento bacteriano. El trabajo que se presenta es una descripción completa del proceso de lisis en función de las dos variables externas e incorporando las internas en forma de parámetros que una vez determinados, mediante ajuste a medidas de densidad óptica realizadas en los cultivos, fijan completamente el proceso de lisis. Permite por lo tanto disponer de un instrumento numérico para la interpretación de la cinemática de la lisis - así como definir, en cualquier momento, la situación de un cultivo, y particularmente su rendimiento una vez que ha lisado completamente. De manera más precisa, el modelo desarrollado se ha formulado de forma factorizada atendiendo fundamentalmente a las etapas de mayor importancia: aproximación de fagos a bacterias, infección y producción de nuevos fagos y explosión bacteriana. Los distintos factores que influyen en el proceso se han considerado a través de expresiones que traducen el comportamiento del cultivo infectado. El desarrollo de estas expresiones ha requerido previamente disponer de una interpretación analítica, dependiente de parámetros determinados con medidas experimentales, de las distintas fases del crecimiento de una población bacteriana en ausencia de fagos, y la formulación de dos expresiones, una empírica que permita interpretar la aproximación de los fagos a las bacterias en nuestras condiciones experimentales, y otra para calcular el número de fagos promedio a ellas adheridos. Ambas expresiones han sido probadas experimentalmente. La validez predictiva del modelo numérico se ha estimado por comparación de los valores de los parámetros de mayor interés biológico (tiempo de generación del fago, tamaño de la explosión bacteriana y constante representativa de la aproximación fago-bacteria) con él obtenidos, y los determinados experimentalmente.

No existen actualmente en la bibliografía modelos alternativos y es posible perfeccionar los cálculos del que se presenta a medida que se requieran previsiones mayores.

ma siguiente:

- En el capítulo II se describe la metodología experimental utilizada para realizar las medidas en que se apoyan tanto los cálculos realizados por el modelo numérico como la comprobación de las hipótesis utilizadas.
- El capítulo III presenta la descripción matemática del proceso de infección y lisis separando las formulaciones que corresponden a las distintas partes del mismo, junto con la exposición de las hipótesis en ellas consideradas. También se describen los métodos numéricos utilizados.
- Las comprobaciones experimentales de las hipótesis del modelo, que son el soporte imprescindible de la formulación teórica expuesta en el capítulo III se presentan en el IV.
- El capítulo V muestra los resultados obtenidos en la interpretación de las curvas de lisis, para cultivos bacterianos infectados en distintos momentos de su evolución y con multiplicidades también diferentes. Se discuten las ventajas y limitaciones del modelo y se evalúan los resultados obtenidos.
- Las conclusiones se resumen en el capítulo VI.

Con objeto de conocer las características de la estirpe de fago utilizada, que sustentan parcialmente las hipótesis base del modelo, presentamos a continuación una revisión bibliográfica del bacteriofago elegido para la realización del trabajo.

## I.2 El fago Lambda. Generalidades

El fago Lambda está compuesto por una molécula de DNA de  $30.8 \times 10^6$  daltons encerrada en una cubierta proteica, la cápsida, de aproximadamente  $30 \times 10^6$  daltons. La cápsida está formada por dos partes bien diferenciadas, denominadas cabeza y cola. La cabeza es una estructura hueca de forma icosaédrica con un diámetro de  $0.055 \mu$  ( $550 \text{ \AA}$ ) y una capacidad de  $9 \times 10^{-5} \mu^3$ . En ella se aloja el DNA de forma bastante compacta, ya que el volumen mínimo ocupado por una varilla de DNA de  $17 \mu$  de longitud y  $0.002 \mu$  de diámetro es de  $5 \times 10^{-5} \mu^3$ . La cola, con una longitud de  $0.15 \mu$  ( $1500 \text{ \AA}$ ) y una anchura de  $0.012 \mu$  ( $120 \text{ \AA}$ ), está formada por 35 anillos iguales y su extremo distal es una fina fibra terminal de  $0.025 \mu$  ( $250 \text{ \AA}$ ) de longitud y  $0.002 \mu$  ( $20 \text{ \AA}$ ) de anchura. El coeficiente de sedimentación de la cabeza sin el DNA es de 114 S y el de la cola de 43 S (Eiserling and Boy de la Tour 1965, Kemp et al. -

1968, Kellemburger and Edgar 1971, Harrison et al. 1973).

El Lambda es un fago temperado y como tal tras su infección a *E. coli* puede entrar en un ciclo de tipo lítico o lisogénico. En el primer caso el DNA del fago se replica y produce nuevos fagos que tras la lisis bacteriana pueden iniciar un nuevo ciclo. En el segundo caso el DNA se integra como profago en el cromosoma bacteriano replicándose con él y confiriendo al huésped inmunidad de superinfección por fagos del mismo tipo. La situación de lisogenia puede alterarse y entrar en el ciclo lítico por la acción de ciertos agentes, por ejemplo, la radiación ultravioleta. La entrada en uno u otro tipo de ciclo depende de las condiciones de infección y de los genotipos del fago y la bacteria.

Actualmente se conoce la localización topológica de los genes que componen el DNA de Lambda, es decir, su mapa genético (Campbell 1971, Echols and Murialdo 1978, Szybalski and Szybalski 1979, Daniels et al. 1980). El DNA de Lambda posee un total de 35 genes, de los cuales 20 codifican la información necesaria para la síntesis de las proteínas que componen la cabeza y la cola del fago, 9 se utilizan en el control de la replicación recombinación y lisis y los seis restantes son genes reguladores; de estos últimos, cuatro se emplean en el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia y tres en el control de la secuencia propia del desarrollo lítico, y por lo tanto un gen regulador es común a ambos tipos de ciclos de vida del fago.

La lisogenia no es una función estrictamente necesaria para el desarrollo del fago Lambda puesto que es el ciclo lítico el que le permite multiplicarse. Por esto los mutantes en genes necesarios para llevar a cabo el ciclo lítico suelen ser letales y se les ha llamado genes esenciales (Jacobs Fuerst and Wollman 1957). El mapeo sistemático del fago Lambda comenzó con el aislamiento de mutantes letales condicionales, es decir, mutantes de estos genes esenciales que solo pueden vivir en ciertas condiciones permisivas (Campbell 1961, Parkinson 1968). El número total de genes que pueden ser mutantes letales condicionales es de 24 (Mount et al. 1968) todos ellos se denominan con letras mayúsculas. Los mutantes no letales son aquéllos que se producen en genes no esenciales para el desarrollo del ciclo lítico, es decir, los genes responsables de la lisogenia, integración, excisión y recombinación vegetativa. El establecimiento y mantenimiento de la lisogenia está controlado fundamentalmente por los genes ci,

cII y cIII y por el gen cro. La proteína codificada por el gen cI es necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia y es una proteína represora del ciclo lítico. Los genes cII y cIII codifican una proteína específica necesaria para el establecimiento de la lisogenia aunque no para su mantenimiento. El gen cro codifica una proteína reguladora que controla un represor de genes del desarrollo lítico. Otros genes necesarios para la lisogenia son los int y xis requeridos para la integración y excisión del profago. Existen mutantes en todos estos genes que con los mutantes en los genes red  $\alpha$ , red  $\beta$ , gam (responsable de la recombinación vegetativa) y rex (no muy bien caracterizado) constituyen el grupo de los genes no esenciales. Por supuesto que existen también locus controladores, es decir, operadores, promotores y terminadores.

El orden cronológico, que no topológico, en el que se manifiestan los genes del fago Lambda una vez que su DNA ha entrado en la bacteria huésped ha conducido a clasificarlos en genes tempranos y genes tardíos (Jacob et al. 1957). Los genes tempranos se expresan 10 minutos después de la infección y los mutantes en estos genes son incapaces de llevar a cabo la replicación del genoma del fago (Eisen et al. 1966, Joyner et al. 1966, Dove - 1966); son los denominados: N, O, P, int, xis, red  $\alpha$ , red  $\beta$  y gam. El gen N es un gen regulador y codifica la información necesaria para la síntesis de una proteína esencial para la expresión de las subsiguientes funciones de los genes tempranos, los mutantes N<sup>-</sup> son incapaces de expresar ninguna función del ciclo lítico. Los productos de los genes O y P están directamente implicados en la replicación por lo que los mutantes defectivos en N, O o P no sintetizan ni DNA ni RNA. Los genes int y xis están relacionados con la integración y excisión necesarias para el establecimiento de la lisogenia y los intercambios cromosómicos. Los genes red  $\alpha$ , red  $\beta$  y gam (implicados en los procesos de recombinación vegetativa) junto con los int y xis dependen del gen N para su expresión.

Los genes tardíos se manifiestan hasta 70 min después de la entrada del DNA de Lambda en la bacteria (Dove 1966, Weigle 1966) y son los que codifican las proteínas estructurales de la cabeza (A, W, B, C, nu3, D, E, FI, FII) y de la cola (Z, U, V, G, T, H, M, L, K, I, J) y los genes Q, R, S y rex. El gen regulador Q cuyo producto es necesario para que se transcriban todos los genes tardíos, el gen R responsable de la producción de -

una endolisina que hidroliza aminoácidos al modo de una endopeptidasa (no tiene acción muramidasa como la de la lisozima), el gen S cuyo producto es necesario para la lisis (no se conoce aun bien) y el gen rex que está implicado en la inhibición de la lisis (del producto del gen R) (Joyner et al. 1966, Dove 1966, Campbell and Del Campillo-Campbell 1963, Harris et al. 1967, Taylor 1971, Mount et al. 1968, Reader and Siminovitch 1971-a-b, - Campbell and Rolfe 1975, Weigle 1966, Parkinson 1968, Boklage et al. 1973, Ray and Murialdo 1975). Cualquier mutante en un gen tardío, aun siendo capaz de completar la replicación, no es capaz de llevar a cabo las últimas etapas del ciclo lítico (Jacob et al. 1957).

Atendiendo a su posición pueden establecerse cuatro grupos de genes: el primero, situado próximo al centro en el mapa genético, incluye los genes necesarios para la regulación de la lisogenia y el ciclo lítico; son los genes cI, cII, cIII, cro y N. El segundo grupo incluye los genes O y P responsables de la replicación temprana y el gen regulador Q, que están situados a continuación del primer grupo de genes. El tercer grupo incluye los genes implicados en las funciones recombinantes, int, xis, red  $\alpha$ , red  $\beta$  y gam, localizados al otro lado de los genes del primer grupo. El cuarto grupo está formado por los genes estructurales de la cabeza (A, W, B, C, Nu3, D, E, FI, FII) y de la cola (Z, U, V, G, T, H, M, L, K, I, J) situados en un extremo del genoma y los genes implicados en la lisis, S y R, localizados en el otro extremo del genoma.

### I.3 Los procesos de adsorción e inyección

Las funciones de las proteínas estructurales de la cola del  $\lambda$  en los procesos de adsorción e inyección no están totalmente definidos; no obstante, parece que la fibra distal es la primera parte que toma contacto con la bacteria y es la responsable de la especificidad del huésped. Se sabe, sin embargo, que la adsorción a E. coli depende de la presencia de un receptor proteico de la membrana de la bacteria codificado por el gen lamb (Randall-Hozelbauer and Schwartz 1973) ya que las bacterias mutantes en él pierden la capacidad de adsorción de fagos Lambda (Thirion and Hofnung - 1972, Scott and Silhaby 1980). La proteína receptora de Lambda se sintetiza preferentemente en polisomas unidos a membranas en forma de un precursor más largo (Randall et al. 1978, Marchal et al. 1980). Recientes estu-

aminoácidos del precursor de la proteína receptora de Lambda han revelado que dicho precursor posee 25 aminoácidos más de extensión en el extremo - amino terminal de la molécula (Hedgreth et al. 1980). Este péptido contiene una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos y es el que inicia la unión del complejo de traslación a la membrana (Blobel and Dobberstein - 1975). La adsorción a la bacteria del fago Lambda es un proceso en dos etapas, la primera es un simple contacto sin pérdida de infectividad por parte del fago (a no ser que se añada cloroformo o etanol en cantidades saturantes), en tanto que la segunda es una asociación irreversible con pérdida de la infectividad, en la que se produce algún cambio conformacional (semejante al que se produce por la adición de cloroformo o etanol) - (Schwartz 1975). Después de la adsorción, la inyección del DNA del fago no se produce automáticamente sino en una etapa subsecuente perfectamente diferenciada como se pone de manifiesto por el hecho de que a bajas temperaturas la adsorción puede ocurrir sin infección (Roa and Scandella 1976, Mackay and Bode 1976a-b).

Es importante destacar que en presencia de maltosa o maltodextrinas en el medio, y en estirpes de bacterias E. coli Mal<sup>+</sup> la producción de receptor proteico es tal que la membrana de la bacteria puede contener hasta  $6 \times 10^3$  sitios de unión para la adsorción del fago (M. Schwartz 1975) de tal manera que la velocidad de adsorción está en la práctica casi exclusivamente limitada por la frecuencia de colisiones entre los fagos y las bacterias (Schlesinger 1932, Schwartz 1975). En estudios realizados "in vitro" se han podido medir las velocidades de asociación y disociación de la proteína receptora a fagos Lambda en diferentes condiciones de fuerza iónica. La cantidad de receptor unido a fago depende mucho de la fuerza iónica, la máxima concentración de complejo se obtiene en presencia de cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) entre  $10^{-3}$  y  $2 \times 10^{-3}$  M. En presencia de  $2 \times 10^{-3}$  M  $Mg^{2+}$  la constante de equilibrio es  $5 \times 10^{-12}$  M, mientras que la constante de asociación es  $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ , consecuentemente la reacción parece estar limitada esencialmente por la difusión.

Para que se produzca la inyección, además de los receptores específicos de la membrana bacteriana se requieren otras funciones de la célula huésped. En efecto, los mutantes pel<sup>-</sup> de E. coli impiden la inyección de fagos aunque estén irreversiblemente unidos a su superficie y solo mutan-



Consecuentemente, se piensa que tanto las proteínas V como las H juegan algún papel en los cambios conformacionales necesarios para la inyección del DNA del fago a la bacteria (Scandella and Arber 1974, 1976).

De acuerdo con lo expuesto parece razonable admitir, en primera aproximación, que la probabilidad de adsorción de un fago Lambda a una bacteria huésped  $Mal^+$ , en adecuadas condiciones de concentración de  $Mg^{2+}$ , sea considerada desde el punto de vista cinemático como la probabilidad de cho que al azar entre ambos.

#### I.4 Funciones de los genes "clear"

Las bacterias lisogénicas, aquellas que contienen el DNA del fago Lambda como profago incluido en su genoma, pueden ser identificadas por dos características: inmunidad de superinfección por otro fago del mismo tipo, incluso lítico, y posibilidad de inducción de lisis por diversos agentes. Ambas características son el resultado de un único sistema de control; la única función del profago es la de sintetizar suficiente proteína represora para impedir la expresión de todos los genes excepto de él mismo. Este represor es capaz también de actuar sobre el DNA de cualquier fago superinfectante del mismo tipo impidiendo la expresión de cualquiera de las funciones tanto del ciclo lítico como lisogénico. Sin embargo, la inducción del profago puede suceder si se inactiva el represor permitiendo, por tanto, la expresión de las funciones necesarias para el desarrollo del ciclo lítico. Aunque la inducción puede suceder espontáneamente, su frecuencia es mucho mayor por acción de algunos agentes como la radiación ultravioleta, la Mitomicina C, etc.

Para que se establezca la lisogenia es necesario que el genoma del fago esté integrado en el de la bacteria huésped y que comience la síntesis del represor para impedir la expresión de las funciones líticas. El establecimiento de la síntesis del represor requiere la participación de 3 genes de control. El mantenimiento de la lisogenia, es decir, de los niveles adecuados de proteína represora, requiere sin embargo la transcripción de un único gen. La función de la proteína represora es la de unirse a dos operadores que controlan la transcripción de los genes adyacentes cuyos produc-

llo lítico. Al unirse a estos operadores el represor impide la transcripción de todos los genes de Lambda menos el suyo mismo.

A pesar de que no se conoce bien como se inactiva el represor por la radiación ultravioleta o por la Mitomicina C, sí se conoce que la inactivación del represor y por tanto la iniciación de la transcripción de los genes implicados en el ciclo lítico produce un efecto de "turn off" sobre el gen impidiéndole sintetizar de nuevo proteína represora. En definitiva, los niveles de represor en la célula están sujetos a 3 sistemas de control: el del establecimiento, el de mantenimiento y el "turn off".

Los genes implicados en la lisogenia fueron identificados mediante el aislamiento de mutantes incapaces de lisogenizar. La turbidez de las placas de la estirpe salvaje de Lambda ( $\lambda^+$ ) es debida al desarrollo de colonias lisogénicas dentro de la zona ocupada por las bacterias lisadas que forman la placa de lisis (la frecuencia espontánea de aparición de lisogenas en la estirpe  $\lambda^+$  es del orden de  $4 \times 10^{-1}$ ). Sin embargo y también espontáneamente se suelen producir del orden de  $10^{-4}$  placas claras ("clear", c), es decir, mutantes incapaces de producir la lisogenia, por supuesto la utilización de mutágenos hace que aumente su producción. Se han aislado hasta tres tipos de placas "clear" (cI, cII y cIII) (Kaiser 1957). Los mutantes cI muestran lisis completa y producen por tanto placas completamente claras (excepto las células derivadas de las bacterias resistentes a la infección), estos mutantes presentan una frecuencia espontánea de lisogenia inferior a  $10^{-5}$ . Los mutantes cII desarrollan placas que tienen en su centro un acúmulo de colonias de bacterias lisogénicas para los mutantes cII, estos mutantes pueden formar lisógenos con frecuencias de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ . Los mutantes cIII que forman placas casi completamente cubiertas de bacterias lisogénicas para este tipo de mutantes, forman lisógenos espontáneamente con una frecuencia de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ .

Las infecciones mixtas de una célula huésped con  $\lambda^+$  y cualquiera de los tres mutantes "clear" rinde células lisogénicas, es decir, el alelo de la estirpe salvaje es dominante. Cuando se infectan por pares de mutantes es posible aislar células mutantes en cII o cIII en sus profagos pero nunca en cI, es decir, los tres genes son necesarios para el establecimiento de la lisogenia pero sólo se requiere el gen cI para su mantenimiento.

gos temperados del tipo Lambda todos activos en *E. coli* pero con diferentes inmunidades (es decir, que bacterias lisógenas para uno cualquiera de los fagos son sensibles a la superinfección de cualquiera de los otros y solo inmune a la superinfección de otro como él), Kaiser and Jacob (1957) demostraron que la región del gen *cI* junto con cortos fragmentos adyacentes del genoma constituían lo que se denominó la región de inmunidad. Esta región es suficiente para conferir inmunidad de superinfección. Jacob and Campbell (1959) y Jacob and Monod (1961) sugirieron un modelo según el cual el gen *cI* codificaba la información necesaria para un represor que es el responsable del mantenimiento del profago en estado inerte y que previene además la expresión de cualquier fago superinfectante homoinmune.

La idea de que el gen *cI* codifica una proteína represora fué sugerida por el aislamiento de variantes sensibles a temperatura (Sussman and Jacob 1962) y por el aislamiento de mutaciones "nonsense" sujetos a supresión por genes bacterianos (Jacob, Sussman and Monod 1962). Lieb (1966) por su parte aisló mutantes sensibles a temperatura en los que el profago se induce por una subida de la temperatura. Pues bien, todos ellos mapean en *cI* confirmando no solo el carácter proteico del represor sino también a esta función como la única concerniente con el mantenimiento de la lisogenia. Bode and Kaiser (1965a) demostraron también mediante experiencias de infección heteroinmune que los genes *cII* y *cIII* no son expresados cuando están como profagos incluídos en el genoma de la bacteria, es decir, que los productos de los genes *cII* y *cIII* son necesarios para el establecimiento de la lisogenia pero no para su mantenimiento.

La proteína represora codificada por el gen *cI* fué aislada por Ptashne (1967a,b). El polipéptido especificado por este gen consiste en una cadena de cerca de 27.000 d. El sitio en el que actúa el represor fué identificado por Ptashne and Hopkins (1968) como las regiones denominadas *v2* y *v1v3* de los mutantes  $\lambda$  virulentos. Estas zonas han podido ser identificadas como el operador  $O_L$  que controla la transcripción desde el promotor  $P_L$  a la izquierda del gen *cI* y el operador  $O_R$  que controla la transcripción desde el promotor  $P_R$  a la derecha de *cI*. Así se representa el sitio de control de la izquierda por  $P_L/O_L$  y el de la derecha por  $P_R/O_R$ . La unión del represor a los operadores requiere 2 o más unidades de represor (Chadwick et al. 1970) Ordal and Kaiser 1973).

cripción temprana de los genes cuyos productos son necesarios para la -  
transcripción de los genes que desarrollan el ciclo lítico.

De acuerdo con lo expuesto queda clara la elección del mutante  $cI$  como la estirpe más adecuada para la realización del trabajo propuesto por ser la que ofrece más garantías de que estaremos ante un proceso lítico - cuando realizemos las infecciones de las bacterias con el fago.

### I.5 El ciclo lítico del fago Lambda

En este apartado vamos a describir los principales hechos que acontecen durante el ciclo lítico del fago Lambda sin entrar en demasiados detalles respecto de las regulaciones que tienen lugar en los distintos tipos de replicación y transcripción de la información necesaria para que se desarrolle el ciclo lítico, a excepción de los detalles que sean necesarios - para comprender el proceso desde el punto de vista que nos ocupa en este - trabajo, es decir, tener la información necesaria acerca del proceso real para poder enunciar las hipótesis de trabajo requeridas para la puesta a - punto de un programa de cálculo que de cuenta de estos procesos de infección y lisis de un cultivo bacteriano mediante fagos líticos.

Como ya hemos referido la entrada en el ciclo lítico requiere la formación de los productos codificados por los genes tempranos que se transcriben hacia la derecha: los genes  $O$ ,  $P$  y  $Q$ . Tanto  $O$  como  $P$  son esenciales para que se produzca la replicación del fago Lambda.  $Q$  codifica una proteína reguladora que promueve la transcripción posterior de los genes tardíos - desde el promotor  $P'_R$  (que no está bajo el control del operador temprano). Para entrar en el ciclo lítico es necesario también prevenir la síntesis del represor codificado por el gen  $cI$  (ver funciones de los genes "clear"). Esta inhibición se consigue con el producto del gen  $cro$ . El  $gp_{cro}$  (producto del gen  $cro$ ) y el  $gp_{cI}$  son pues productos antagónicos. (La síntesis de  $gp_{cro}$  impide la transcripción y, por tanto, la síntesis de  $gp_{cI}$ . La síntesis de  $gp_{cI}$  impide la replicación y, por tanto, la síntesis de  $gp_{cro}$ ).

Tras la infección se expresan únicamente los genes tempranos  $N$  y  $cro$ . La síntesis de  $gp_N$  permite la expresión de los genes tempranos necesarios

por cI sólo puede suceder después de que los genes tempranos más inmediatos se han expresado y en todo caso cuando el balance entre los productos de los genes cro y cI determinan el camino a seguir: desarrollo lítico o lisogénico. Por supuesto que en estirpes mutantes en cI la elección será siempre en el sentido del desarrollo lítico. La utilización de los productos de los genes cro, O, P y Q conduce a la expresión de los genes tardíos y, por tanto, al ciclo lítico.

La primera etapa tras la infección es la conversión del DNA de forma lineal (necesaria para la infectividad) a la forma circular cerrada (Bode and Kaiser 1965a, Ogawa and Tomizawa 1967). La replicación del DNA de Lamb da tiene lugar por el mismo mecanismo responsable de la replicación del DNA de la bacteria: se sintetizan cortos fragmentos de DNA discontinuamente en la dirección 5' → 3' y después se unen covalentemente formando una nueva cadena. Ya que son sólo 2 los genes del fago cuya función concierne a la replicación y ésta debe de realizarse merced a actividades ya existentes en la bacteria huésped para la síntesis de DNA (Fangman and Feiss - 1969).

No están claras las funciones exactas de los genes O y P aunque se sa be que son necesarias para coordinar la replicación del genoma de Lambda - (Tomizawa 1971). Dado que como hemos dicho la actividad replicativa en sí misma depende de la célula huésped, se ha sugerido que los genes O y P estén implicados en al menos dos actividades: la iniciación de la replicación del genoma circular de Lambda tras la infección y la iniciación de la replicación en rodillo característica de la replicación tardía necesaria para la producción de los concatémoros requeridos para la maduración de las partículas del fago. Esta supuesta actividad iniciadora podría ser una actividad nucleásica (McMacken et al. 1975). En definitiva, se admite un modelo de maduración del DNA de Lambda según el cual y tras la transformación del DNA lineal infectivo a la forma circular cerrada se produce una replicación temprana circular cuyo origen de replicación se sitúa aproximadamente en el punto 80% desde el extremo izquierdo; esta replicación es normalmente bidireccional. Estas formas circulares conducen después a formas concatéméricas lineales merced a la replicación tardía en forma de círculo rodante. No se conoce con certeza si este tipo de replicación utiliza siempre el mismo punto de inicio aunque sí se conoce que la nucleasa codi-

las funciones Gam son necesarias para inhibir a la nucleasa RecBC y permitir el comienzo de esta replicación tardía. El círculo rodante genera una larga cola concatémica que sirve como sustrato usual para la producción de DNA maduro para su empaquetamiento en las cabezas de Lambda. Mediante recombinación también pueden producirse oligómeros circulares de DNA que pueden ser después cortados a la forma concatémica lineal. Esta es pues una vía alternativa para la producción de DNA maduro cuando por alguna razón la replicación tardía normal está inhibida.

Para entonces la transcripción tardía ha logrado la expresión de todos los genes necesarios para la formación y maduración de la capsida del fago (ver Estructura y Composición del Fago Lambda). Por supuesto que la fabricación de esta proteína utiliza también la maquinaria de síntesis proteica de la célula huésped. La salida de los fagos al exterior de la bacteria requiere ahora la actividad endopeptidasa de la enzima codificada por el gen P del fago (también dependiente del gen Q). Mutantes en este gen acumulan fagos en el interior de la bacteria. Tras la lisis bacteriana los fagos libres, que han alcanzado la madurez, están en disposición de infectar otras bacterias que encuentran en el medio. Sin embargo es necesario hacer notar que no todos los fagos que se están produciendo completan su formación antes de la explosión de la bacteria (Karamata et al. 1962, Murialdo and Siminovitch 1972).

En resumen, podemos afirmar que se conocen suficientemente las etapas más importantes del proceso de infección y lisis de bacterias por fagos. Este conocimiento permite formular, como veremos en capítulos posteriores, una serie de hipótesis en orden a expresar matemáticamente lo que biológicamente está ocurriendo en el proceso. Este es el caso de las hipótesis consideradas para interpretar el proceso de aproximación del fago a la bacteria y la posibilidad de que no todos los fagos producidos sean infectivos.

Además de las hipótesis cuya base es la información bibliográfica expuesta, ha sido necesaria la consideración de otras adicionales, que sin entrar en contradicción con los datos reales han permitido la elaboración del modelo numérico que se propone. Una discusión detallada de todas las hipótesis se presenta en el capítulo III.

## II.1 Introducción

En este capítulo vamos a presentar las técnicas que han sido utilizadas para llevar a cabo la experimentación necesaria en el trabajo que exponemos en capítulos posteriores y cuyos objetivos vimos en la introducción de esta memoria.

En la experimentación realizada en este trabajo pueden distinguirse dos partes: la que aporta los datos requeridos para el funcionamiento del modelo numérico, y la que se ha efectuado para comprobar la validez tanto de algunas de las hipótesis consideradas como de las predicciones más importantes.

La simplicidad y universalidad de las técnicas utilizadas no se debe a imposibilidades de tipo técnico sino a que es objetivo fundamental de este trabajo el que pueda obtenerse la descripción del proceso de lisis proporcionada por el modelo numérico, a partir de determinaciones relativamente sencillas y al alcance de cualquier laboratorio de microbiología. Sin embargo ha sido necesario realizar un notable esfuerzo experimental para obtener la sensibilidad suficiente para que los resultados obtenidos ofrezcan la necesaria consistencia.

## II.2 Estirpes microbiológicas utilizadas

La estirpe bacteriana utilizada en este trabajo ha sido E.coli C<sub>600</sub> (derivada de E.coli K12), es requiriente en Histidina, Leucina, vitamina B<sub>1</sub> y Lactosa. De los distintos mutantes de ciclo lítico del fago  $\lambda$  se ha utilizado, por las razones expuestas en la Introducción, el  $\lambda_{\text{clear I}}$ .

### II.3 Medios de crecimiento y lisis

#### a) Crecimiento y lisis en medio líquido:

Se ha utilizado un medio rico de cultivo compuesto por:

Peptona bacteriológica	25.0 g
Mg SO <sub>4</sub>	2.5 g
Na Cl	5.0 g
Vit B <sub>1</sub>	100 µg
Agua destilada	1000 ml

Todos los componentes se esterilizan juntos en autoclave, durante - 20 minutos, a una presión de 1.5 atmósferas.

#### b) Crecimiento y lisis en medio sólido:

Los crecimientos bacterianos se realizaron con agar nutritivo, que se suplementó con Mg<sup>++</sup> (2.5 g /1 Mg SO<sub>4</sub>), para los crecimientos de fagos.

Agar nutritivo:

Nutrien Agar	25.0 g
Agua destilada	1000 ml

Agar blando (utilizado en los crecimientos de fagos):

Peptona bacteriológica	25.0 g
Na Cl	5.0 g
Mg SO <sub>4</sub>	2.5 g
Nutrien Agar	4.0 g
Agua destilada	1000 ml

La esterilización se realizó en autoclave durante 20 minutos a presión de 1.5 atmósferas.

El agar nutritivo se vierte sobre placas estériles a elevada temperatura; una vez que ha solidificado las placas invertidas se colocan en la estufa a 37° C.



## II.4 Condiciones de cultivo

Las condiciones a las que han estado sometidos los cultivos bacterianos, tanto en ausencia como en presencia de fagos, han sido siempre las mismas en toda la experimentación realizada durante el trabajo.

De un cultivo crecido durante la noche (aproximadamente 16 horas) en matraz de 50 ml, con 20 ml de medio de crecimiento, a una temperatura de 37° C y agitación en plataforma móvil "Laboratory Rotator Mod. G2-New Brunswick" a 250 r.p.m. se inoculaba un matraz (con tubo lateral incorporado) de 50 ml que contenía 20 ml de medio, con el volumen necesario para conseguir que la densidad óptica inicial de los cultivos estudiados sea siempre aproximadamente la misma. Concretamente, se inoculaba para comenzar el crecimiento a 0.06 u.o./ml a 450 nm. De esta forma, pasada aproximadamente una hora se alcanza la fase exponencial de crecimiento. Las condiciones de agitación y temperatura eran las mismas que en el cultivo de noche.

En los casos en los que los cultivos se utilizaron para producir lis bacterianas, se introdujo en el momento del crecimiento deseado la cantidad de fagos necesaria para obtener la multiplicidad de infección requerida; procurando en todos los casos que el volumen añadido fuera mínimo, con objeto de no producir alteraciones sustanciales en el volumen total del cultivo. Para ello se realizaron las diluciones del stock de fagos más adecuadas en cada situación concreta, de momento y multiplicidad de la infección.

## II.5 Evaluación del crecimiento bacteriano

El seguimiento rutinario del crecimiento bacteriano, tanto en ausencia como en presencia de fagos, se realizó por turbidimetría, en un espectrofotómetro SPECTRONIC-700, midiendo la absorción por ml y cm de paso óptico, a una longitud de onda de 450 nm. La referencia utilizada fué, en todos los casos, el mismo medio de cultivo. La utilización de matraces con tubo lateral incorporado, de 1 cm de diámetro, permitió durante las primeras horas del crecimiento efectuar las medidas sin necesidad de ex-

traer una muestra; consiguiendo así disminuir el tiempo en que el cultivo dejaba de agitarse y el riesgo de contaminación, a la vez que no disminuía el volumen. Pasada la primera parte del crecimiento, cuando era preciso realizar diluciones, éstas se hacían en pequeños volúmenes, con objeto de que la extracción de muestras no condujera a grandes disminuciones del volumen total del cultivo. Las medidas se realizaron en cubetas - que permitían realizar la determinación con volúmenes de 1 a 2 mililitros.

El interés en no disminuir el volumen del cultivo se debe, además - de a pretender homogeneizar lo más posible las condiciones experimentales, a que el gran número de medidas de densidad óptica en función del tiempo, realizadas en los cultivos estudiados, hubiera conducido, con la extracción de muestras de volúmenes superiores, a consumir prácticamente el volumen total disponible.

Como es sabido, la utilización de la turbidimetría para seguir el - crecimiento de una población bacteriana, necesita restringirse a la zona de densidades ópticas en la que se cumple la ley de Beer; es decir, aquella en que la relación entre la densidad óptica y la bacteriana es lineal. En nuestro caso, se ha determinado dicha relación, mediante medida y análisis estadístico según se expone en IV.2.1. Consecuentemente, fué necesario determinar el valor absoluto del número de bacterias para diferentes densidades ópticas. Para realizar dicha determinación se utilizó la técnica de recuento de viables que exponemos a continuación.

Esta técnica se basa en la hipótesis de que, si se diluye una suspensión de bacterias adecuadamente y después se siembra en medio sólido - alícuotas de las diluciones adecuadas se obtiene un número de colonias - tal que se puede afirmar que cada una de ellas es el resultado de las duplicaciones de una única bacteria. Por lo tanto, es posible así determinar el número de bacterias vivas en la suspensión original teniendo en cuenta sólo el factor de dilución. El camino experimental seguido para esta determinación es el siguiente:

De un cultivo creciendo en las condiciones descritas anteriormente se toman muestras (50  $\mu$ l) a distintos valores de densidad óptica. Las muestras se diluyen en Na Cl 0.15 M según aparece en las tablas II.1 y II.2.

Las diluciones apropiadas para la obtención del orden de 30 a 300 colonias por placa se determinaron mediante una etapa previa de tanteo - que permitió conocer unos valores aproximados del número de bacterias por mililitro presentes en la suspensión original.

Como se muestra en las tablas, hay tres series de diluciones y en - cada una varias etapas. Dos de las series son semejantes en el resultado final de la dilución y proporcionan una cierta compensación en los errores de pipeteo.

En todos los casos se sembró un volumen de 0.1 ml que se extendió - con asa de vidrio sobre placas de agar nutritivo. Para cada conteo el número de placas sembradas estuvo comprendido entre 9 y 27. De esta forma - se obtuvieron los valores que relacionan densidad óptica y número de bacterias.

## II.6 Preparación de stocks de fagos y bacterias

### a) Stocks de fagos.

Los stocks de fagos que han sido utilizados para la realización de este trabajo, se obtuvieron por infección de cultivos crecidos en las condiciones habituales. La infección se realizó cuando dichos cultivos alcanzaban una unidad de densidad óptica a una multiplicidad de infección que asegurara la lisis total de las bacterias.

El cultivo se mantenía en las mismas condiciones que en ausencia de fagos hasta el final de la lisis. El lisado obtenido se centrifugaba a baja velocidad, para separar los fagos, de las bacterias no lisadas y los restos celulares, en una centrífuga "Beckman J-21" a 2500 revoluciones durante 20 minutos. El sobrenadante se filtraba con un filtro Millipore estéril de 0.45 $\mu$  de diámetro de poro que sólo permite el paso de los fagos. Los fagos se cuentan (ver II.7) y se conservan a 4° C.

### b) Stock de bacterias.

Cada tres meses se preparan resiembras en tubos inclinados de agar

nutriente, inoculados a partir de una colonia crecida en placa. El crecimiento en placa de dichas colonias se realiza siempre a partir de un cultivo inoculado con una muestra tomada de uno de los tubos de la anterior resiembra. Se mantienen sin embargo, entre resiembra y resiembra, algunos tubos de la anterior, hasta la comprobación del éxito en la continuidad del mantenimiento de la cepa en la nueva resiembra.

## II.7 Método de conteo de fagos

Siempre que ha sido necesario conocer el número de fagos vivos presentes en una suspensión se ha realizado el conteo según el método de Gratia (1.936). Dicho método consiste en esencia en la producción y conteo de placas de lisis tras la infección con fagos de una suspensión de bacterias que al crecer en placas de agar nutritivo forman un césped uniforme de bacterias. El césped bacteriano se obtiene extendiendo sobre la placa una suspensión en agar blando de 0.2 ml de un cultivo de E. coli -  $C_{600}$  en fase exponencial de crecimiento a aproximadamente 1.0 u.o./ml.

Las diluciones de la suspensión de fagos se realizaron en el mismo medio de cultivo de las bacterias. De forma que el número de placas de lisis contadas estuviera comprendido entre 30 y 300.

El agar blando se calienta hasta fundirlo y luego se termostatiza a 40° C en tubos con 2.5 ml. A cada tubo se añade:

0.2 ml de la suspensión de bacterias

0.1 ml de la dilución deseada de los fagos

Esta mezcla tras ser agitada se vierte sobre las placas de agar nutritivo, extendiéndose por la superficie. Cuando el agar blando ha sido absorbido las placas se mantienen aproximadamente 15 min. en la estufa a 37° C con las tapas ligeramente abiertas para que se sequen bien. Después se cierran e invierten manteniéndolas así hasta el día siguiente (aprox. 16 h). Una vez transcurridas las 5 primeras horas se comienza ya a observar el césped y pequeñas placas de lisis sobre la superficie.

En la práctica, la obtención de placas de lisis distribuidas uniformemente sobre el césped y de tamaño fácilmente observable, depende en gran medida del grosor de las placas de agar nutritivo, de su grado de humedad (son preferibles placas de agar bien seco) y de la temperatura del agar blando<sup>(1)</sup>. En definitiva, cada uno de los factores indicados influye notablemente en los resultados obtenidos.

La ventaja de este método sobre la extensión directa de la mezcla fagos-bacterias sin agar blando, radica en la mayor facilidad con que se distribuyen las bacterias y los fagos sobre la superficie de la placa. Además, la porosidad de la capa de agar blando permite la rápida difusión de los fagos y la obtención de placas de lisis de mayor tamaño que las obtenidas por extensión.

En todos los contajes realizados en este trabajo, se ha pretendido obtener la mayor precisión posible. Con este fin, para cada contaje se han realizado en general varias diluciones, cada una de ellas se ha extendido sobre un mínimo de 3 placas, procurando contar en cada una, un número de placas de lisis que permitiera obtener el menor error posible.

## II.8 Determinaciones del número de fagos libres en función del tiempo en los procesos de aproximación

Como veremos en capítulos posteriores, ha sido necesario comprobar la validez de la expresión representativa del ritmo de adsorción de fagos a bacterias y determinar el valor del parámetro que proporciona la velocidad de la aproximación. Para realizar dicha comprobación es necesario conocer la evolución en función del tiempo del número de fagos/ml que no se han aproximado a bacterias, es decir, los fagos libres. El método utilizado para ello ha sido el siguiente:

Se han realizado infecciones de cultivos bacterianos crecidos en las condiciones experimentales habituales (en el momento y con la multiplicidad de infección deseada) de los que se han tomado muestras a intervalos de aproximadamente cinco minutos desde el momento de la infección, que convenientemente diluidas han sido filtradas con un filtro Millipore de  $0.45\mu$  de tamaño de poro. La filtración permite separar los fagos li-

bres de las bacterias, tanto infectadas como sin infectar. A partir de estas muestras se ha determinado el número de fagos libres por contajaje de - placas de lisis utilizando el método de Grattia. Los contajajes se han rea- lizado igualmente en las muestras antes de la filtración con objeto de determinar paralelamente el número de placas de lisis correspondientes a - bacterias infectadas. Puesto que en la mezcla antes de la filtración ha- brá fagos libres y fagos que ya se han aproximado a bacterias. Los últi- mos darán origen a placas de lisis que corresponderán a bacterias infectadas, cuyo número podría determinarse por simple sustracción de los resulta- dos de los contajajes correspondientes a las muestras tomadas antes y des- pués de la filtración.

En todos los contajajes se han procurado realizar aquellas diluciones que permitieran contar un número de placas de lisis comprendido entre 30 y 300 (intervalo óptimo según vimos en II.7), así mismo para cada una de las dos series de contajajes realizados a cada tiempo se han extendido las alícuotas de la dilución correspondiente sobre un mínimo de tres placas - de agar nutritivo. De esta forma los valores obtenidos para cada tiempo - son el valor medio de los procedentes de cada una de las placas, con un - error que se ha calculado como el error en el valor medio.

Antes de utilizar la filtración para separar los fagos libres de - las bacterias se hicieron una serie de pruebas sustituyendo la etapa del filtrado por una centrifugación. Los resultados obtenidos fueron poco sa- tisfactorios por las grandes fluctuaciones obtenidas que atribuimos a que posiblemente se estuvieran considerando como fagos libres bacterias infectadas que no hubieran sedimentado. Puesto que no era conveniente aumentar el tiempo de centrifugación pensamos en la filtración que obviaba este - problema. Para evitar la posible colmatación del filtro y la consiguiente perturbación de los resultados las muestras se diluían como hemos visto antes de la filtración.

Otro método para determinar el número de fagos libres es a partir -

del número de bacterias infectadas, conocido el número de fagos inicial. Como vemos es un método indirecto en el que el número de fagos inicial es decisivo en los resultados; puesto que el número de fagos libres en función del tiempo se determina como diferencia entre el número de fagos inicial y el de bacterias infectadas al tiempo correspondiente. La determinación del número de bacterias infectadas requiere la inactivación de los fagos libres con suero anti-fago. Esto supone disponer de un suero en el que se conozca su capacidad de inactivación que, aunque es perfectamente determinable, inevitablemente supone un error adicional en el cálculo de las bacterias infectadas. Otra restricción adicional es la debida a que al determinarse los fagos libres como diferencia entre el número de fagos inicial y el número de bacterias infectadas, sólo podrán realizarse las medidas para relaciones iniciales fago bacteria en las que la probabilidad de que a una misma bacteria se aproxime más de un fago sea mínima, ya que de lo contrario el número de fagos libres calculado a partir de las bacterias infectadas sería superior al real y consecuentemente los resultados obtenidos carecerían de validez. Es por las razones anteriores que consideramos este método menos adecuado que el de filtración utilizado.

## II.9 Preparación y calibración del suero anti- $\lambda_c$

En el siguiente apartado de este capítulo veremos que es necesario disponer de un antisuero capaz de inactivar los fagos libres. A continuación exponemos la forma en que se ha preparado y calibrado el suero anti  $\lambda_c$  que ha sido necesario obtener con este fin:

El animal utilizado para la inoculación fué el conejo. Concretamente 6 ejemplares, 3 machos y 3 hembras que se sometieron a distintas condiciones de inoculación formando 3 grupos. Un primer grupo al que no se inyectó con fagos sino simplemente 1 ml de adyugante, que se utilizaba como control. El segundo grupo se inoculó con 1 ml de adyugante y 1 ml de una solución de fagos a una concentración por mililitro de  $1.28 \times 10^{13}$ , que corresponde aproximadamente a 700  $\mu$ g de proteína equivalente. El tercer grupo se inoculó con 1 ml de una solución de fagos al doble de concentración que en el segundo grupo, es decir

$2.56 \times 10^{10}$  fagos/ml (1400  $\mu$ g prot. eq.).

A los tres grupos se les practicaba durante un período total de 4 semanas, dos inoculaciones semanales (en las condiciones descritas) seguidas de una sangría por punción cardíaca en la que se extraían 5 ml de sangre por pinchazo. El suero obtenido se titulaba para ir controlando la aparición de anticuerpos capaces de reaccionar con el antígeno. Para ello se ha preparado una mezcla suero-fagos en la que se conocía previamente el número de fagos/ml existentes. De forma que tras un tiempo de terminado de incubación a  $37^{\circ}$  C, se puede determinar el número de fagos/ml supervivientes. La fracción de fagos supervivientes dependerá de la capacidad de inactivación del suero y de la dilución final del suero en la mezcla suero-fagos. Según la bibliografía la cuantificación de la actividad del suero puede realizarse por medida en función del tiempo del número de fagos no inactivados; ya que la variación en función del tiempo del número de fagos, es función de una constante propia del suero y de la dilución del mismo en la mezcla suero-fagos. Dicha variación viene descrita según la siguiente expresión (Kay D. 1972):

$$N_F = N_{F0} e^{-kt/D} \quad (\text{II.9.1})$$

donde  $N_F$  y  $N_{F0}$  son respectivamente el número de fagos supervivientes a tiempo  $t$  y el número inicial de fagos.  $k$  es una constante propia del suero y  $D$  la dilución final del suero en la mezcla.

A partir de los sueros extraídos semanalmente se ha determinado el número de fagos supervivientes obteniéndose para cada suero (según los grupos establecidos) el valor de la constante de la expresión II.9.1. Es posible por tanto observar la evolución de la actividad del suero durante las 4 semanas en las que se han realizado las extracciones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura II.1. En ellos puede apreciarse que hasta la tercera semana no se observa aumento de actividad en ninguno de los sueros. El aumento de actividad es sin embargo muy rápido entre la tercera y cuarta semana observándose pequeñas diferencias entre los distintos sueros que no parecen ser sistemáticas puesto que la medida realizada tras efectuar la sangría total (5ª semana) es ya indistinguible dentro del error estadístico de las determinaciones. Puesto que la capacidad



de respuesta inmunológica es semejante en todos los sueros obtenidos, independientemente de las condiciones de inoculación de los conejos de que se obtuvieron, se procedió a la mezcla de los mismos antes de realizar la determinación definitiva del valor de la constante de la expresión II.9.1. Para ello se realizaron las medidas del número de fagos supervivientes a intervalos de cinco minutos desde el momento en que se efectuó la mezcla fagos-suero y hasta los 40 minutos<sup>(2)</sup>. La dilución adecuada del suero para realizar estas medidas se estimó a partir de los valores obtenidos previamente para la constante, en las pruebas de actividad realizadas la quinta semana; de forma que el número de placas de lisis contadas en cada placa fuera el óptimo para el conteo. Para cada uno de los tiempos a los que se realizaron las medidas se sembraron 6 placas. Los valores del número de fagos supervivientes en función del tiempo fueron ajustados por mínimos cuadrados a la expresión (II.9.1) (utilizando el método numérico de minimización que se describe en III.6). En la figura (II.2) se muestra el resultado de dicho ajuste que proporciona un valor para el parámetro  $k$  de  $50 \pm 3$ . La interpretación de los datos experimentales es adecuada como puede observarse por la relación  $\chi^2$  número de grados de libertad.

Una vez obtenido el suero anti  $\lambda_c$  y realizada su calibración se conserva a  $30^\circ \text{C}$  al 50% en glicerina. Su estabilidad en estas condiciones es muy buena no detectándose pérdida de actividad tras 1 año de su preparación.

## II.10 Medida del tiempo de generación del fago (período latente) y el tamaño de la explosión de la bacteria.

Nuestro interés en la determinación experimental del tiempo de generación del fago y el tamaño de la explosión bacteriana, se debe a que son dos de los parámetros en función de los que se realiza la interpretación numérica del proceso de lisis según veremos en el capítulo III. Es por ello que su determinación experimental permite la comprobación de la validez de las correspondientes predicciones del modelo.

El método utilizado para la medida del tiempo de generación del fa-

go y el tamaño de la explosión ha sido el ya clásico, descrito por Ellis y Delbrück en 1939 . Dicho método consiste esencialmente en la infección de una muestra de un cultivo bacteriano de concentración conocida con un número de fagos del mismo orden que el de las bacterias, tras un tiempo para que se produzca la adsorción se toman muestras aproximadamente cada cinco minutos que convenientemente diluidas, se plaquean para más tarde contar placas de lisis producidas por bacterias infectadas; puesto que los fagos no adsorbidos se neutralizan con suero anti fago.

El plaqueo se realiza sobre dos series de diluciones para cada tiempo. En una de ellas puede observarse, al contar placas de lisis, el período correspondiente a la latencia (tiempo de generación del fago). El número de placas aparecido deberá permanecer prácticamente constante hasta que de forma rápida y brusca se experimenta una subida considerable, que corresponde a la lisis de las primeras bacterias infectadas.

El plaqueo de la segunda dilución (aproximadamente cien veces más diluida que la anterior si por ejemplo se espera un tamaño de explosión del orden de la centena) permite observar, al contar las placas de lisis, un aumento relativamente constante a partir del período latente, que después de un cierto tiempo (período de crecimiento o subida) se estabiliza.

El tamaño de la explosión se determina a partir de la relación entre el promedio de placas de lisis contadas en la segunda serie de diluciones, después del período de subida, y el promedio en las correspondientes a la primera serie de diluciones hasta el final del período latente. Concretamente el procedimiento seguido fué el siguiente: de un cultivo de E. coli  $C_{600}$  crecido en las condiciones experimentales habituales se separa una alícuota de 0.9 ml cuando alcanza una densidad óptica de 0.5 u.o/ml que corresponde a  $1.2 \times 10^8$  bact./ml. A los 0.9 ml del cultivo se le añaden 0.1 ml de una solución de fagos  $\lambda_c$  que permita obtener en la mezcla fagos-bacteria una multiplicidad de infección de 1/1 (esta mezcla se mantiene a 37° C durante el tiempo en que se realizan las medidas). Desde el momento de la infección se dejan transcurrir cinco minutos para que se produzca la adsor

ción. El número de fagos adsorbidos dependerá de la velocidad de aproximación.

Pasada esta etapa de adsorción a la mezcla se le -  
añade el volumen necesario de suero anti-  $\lambda_c$  para inactivar en los si-  
guientes cinco minutos el 99% de los fagos libres<sup>(3)</sup>, dicho volumen y la  
dilución del suero es calculable conocido el número de fagos libres y el  
valor de la constante K de la expresión II.9.1 que ha sido determinada ex  
perimentalmente como ya hemos visto. Transcurridos los 5 min. durante los  
que se produce la inactivación de los fagos libres se realizan las medi-  
das del número de placas de lisis en función del tiempo que corresponden,  
como hemos visto, al número de bacterias infectadas. Para ello se realizó  
a intervalos de tiempo entre 1 y 3 minutos el plaqueo de muestras<sup>(4)</sup> co-  
rrespondientes a dos series de diluciones que permitan observar el perío-  
do latente, la subida y la fase de eclipse, puesto que desde que se pro-  
duzcan las explosiones de las primeras bacterias el número de placas de -  
lisis por placa irá aumentando, hasta alcanzar la estabilidad una vez pro  
ducidas todas las explosiones de las bacterias infectadas inicialmente. -  
Antes de obtener los resultados definitivos, que se presentan en el capítu-  
lo V, fué necesario realizar medidas previas que permitieran conocer -  
las diluciones a efectuar de forma que el número de placas de lisis conta-  
do fuera adecuado. Esto es necesario porque no se conoce el número de bac-  
terias que serán infectadas tras la adsorción; puesto que aunque se conoz  
ca el número de fagos adsorbidos no se conoce el número de fagos aproxima  
do por bacteria. También es necesario estimar previamente el orden del ta  
maño de la explosión para que la relación entre las dos diluciones a par-  
tir de las que se realiza la siembra, sea la adecuada.

(1) La temperatura debe ser de 40°C para que el agar blando se extienda - bien sobre las placas. Temperaturas inferiores conducen a una solidificación prematura lo que produce una mala extensión. Mayor temperatura y exposiciones demasiado prolongadas de las bacterias y fagos en el agar blando pueden producir la muerte a algunas bacterias y fagos.

(2) Las determinaciones realizadas durante las cuatro primeras semanas se hicieron sólo para un tiempo, en concreto a los 20 min de realizar la mezcla fagos suero, puesto que los valores de las constantes obtenidas sólo eran requeridas para observar la evolución del incremento de la actividad del suero y consecuentemente era suficiente un valor aproximado. El valor de la constante que aparece en la fig. II.2 para la 5ª semana ya se obtuvo realizando las determinaciones para varios tiempos.

(3) El porcentaje de fagos libres que deben inactivarse ha de calcularse procurando que sea el máximo pero teniendo en cuenta que la capacidad de inactivación del suero debe haber prácticamente desaparecido en la dilución final que se extienda sobre las placas; puesto que si no fuera así, los fagos libres procedentes de las bacterias infectadas serían inactivados y consecuentemente los resultados obtenidos no serían válidos.

(4) Para cada tiempo se sembraron alícuotas de 0.1 ml de las diluciones - deseadas sobre 5 placas de agar nutritivo para cada una. Procurando que - al menos en una de las dos series de diluciones el número de placas de lisis contado por placa estuviera comprendido entre 30 y 300.

TABLA II.1 Series de diluciones utilizadas para realizar los contejes de bacterias de muestras correspondientes a valores - de densidad óptica inferiores a 0.3 unidades ópticas por mililitro.

TABLA II.2 Series de diluciones utilizadas para realizar los contejes de bacterias de muestras correspondientes a valores - de densidad óptica superiores a 0.3 unidades ópticas por mililitro.

DILUCIONES UTILIZADAS PARA VALORES DE D.O MENORES DE 0.3 u.o/ml

Concentración Suspensión Muestra	Dilución en ClNa 0.15 M.			Concentración Suspensión Siembra	Siembra 0.1 ml Nº Cel./Placa
	1 DIL.	2 DIL.	3 DIL.		
Co	1/10	3/100	1/100	Co x 3 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 3 x 10 <sup>-6</sup>
			2/100	Co x 6 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 6 x 10 <sup>-6</sup>
			3/100	Co x 9 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 9 x 10 <sup>-6</sup>
	1/10	2/100	1/100	Co x 2 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 2 x 10 <sup>-6</sup>
			2/100	Co x 4 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 4 x 10 <sup>-6</sup>
			3/100	Co x 6 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 6 x 10 <sup>-6</sup>
	3/10	1/100	1/100	Co x 3 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 3 x 10 <sup>-6</sup>
			2/100	Co x 6 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 6 x 10 <sup>-6</sup>
			3/100	Co x 9 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 9 x 10 <sup>-6</sup>

TABLA II.1

DILUCIONES UTILIZADAS PARA VALORES DE D.O MAYORES DE 0.3 u.o/ml

Concentración Suspensión Muestra	Dilución en ClNa 0.15 M.		Concentración Suspensión Siembra	Siembra 0.1 ml Nº Cel./Placa
	1 DIL.	2 DIL.	3 DIL.	
Co	1/10	2/100	1/100	Co x 2 x 10 <sup>-6</sup>
			2/100	Co x 4 x 10 <sup>-6</sup>
			3/100	Co x 6 x 10 <sup>-6</sup>
	1/10	1/100	Co x 10 <sup>-5</sup>	Co x 10 <sup>-6</sup>
		2/100	Co x 2 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 2 x 10 <sup>-6</sup>
		3/100	Co x 3 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 3 x 10 <sup>-6</sup>
	2/10	1/100	Co x 2 x 10 <sup>-5</sup>	Co x 2 x 10 <sup>-6</sup>
			2/100	Co x 4 x 10 <sup>-6</sup>
			3/100	Co x 6 x 10 <sup>-6</sup>

TABLA II.2

FIGURA II.1 Evolución de la actividad del suero anti  $\lambda_c$  en función del tiempo transcurrido desde la primera inoculación. La figura superior muestra la evolución del valor de la constante de la expresión II.9.1, durante 5 semanas. En la figura inferior se representa el porcentaje de fagos desaparecidos, que corresponde a los valores de la constante referida, para un tiempo de actuación de 5 minutos y tras una dilución del suero 1/10, en función del tiempo transcurrido desde la inoculación.

FIGURA II.2 Logaritmo neperiano del número de fagos libres y error en función del tiempo. La línea continua muestra la interpretación correspondiente al mínimo obtenido tras el ajuste con la expresión (II.9.1).



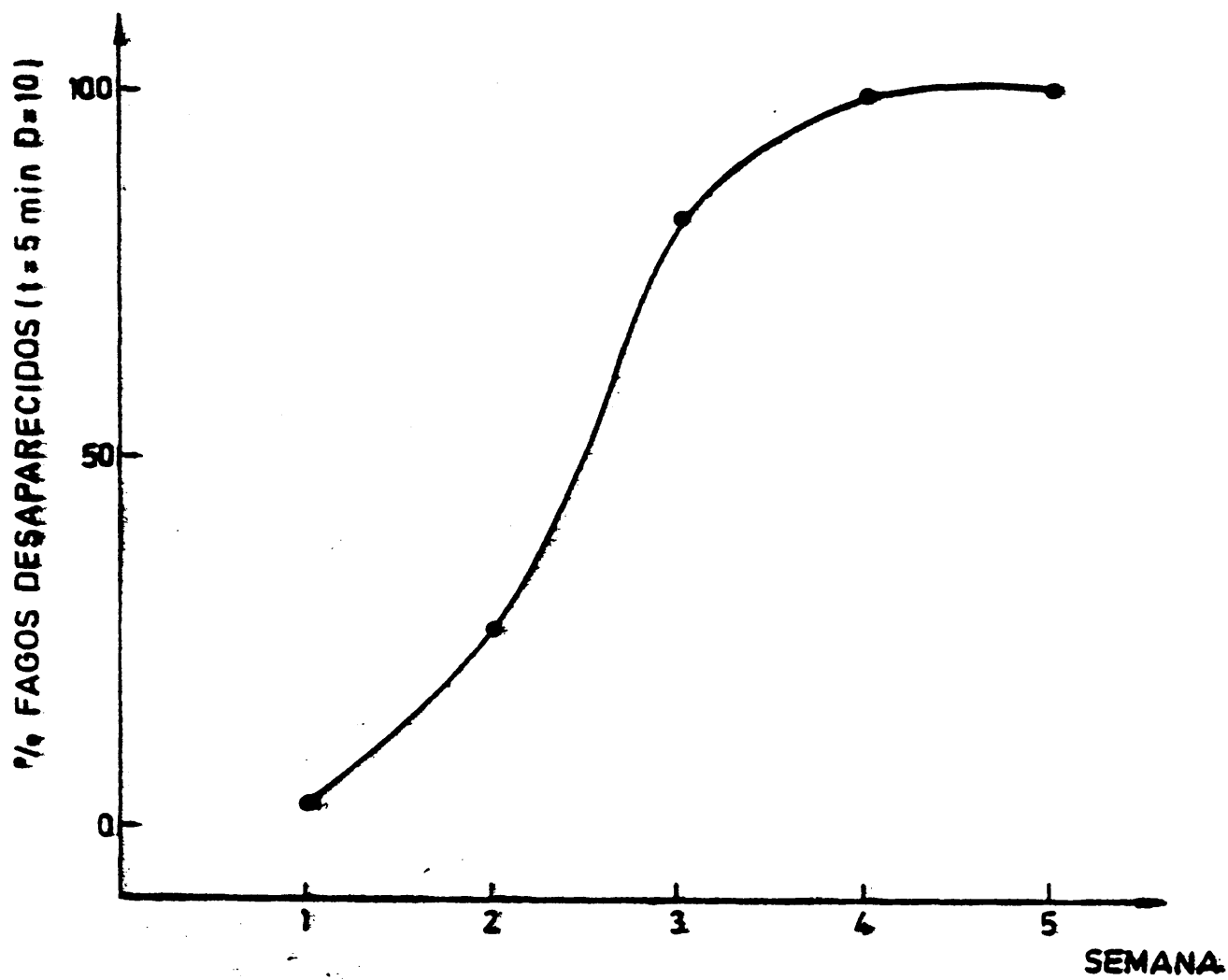
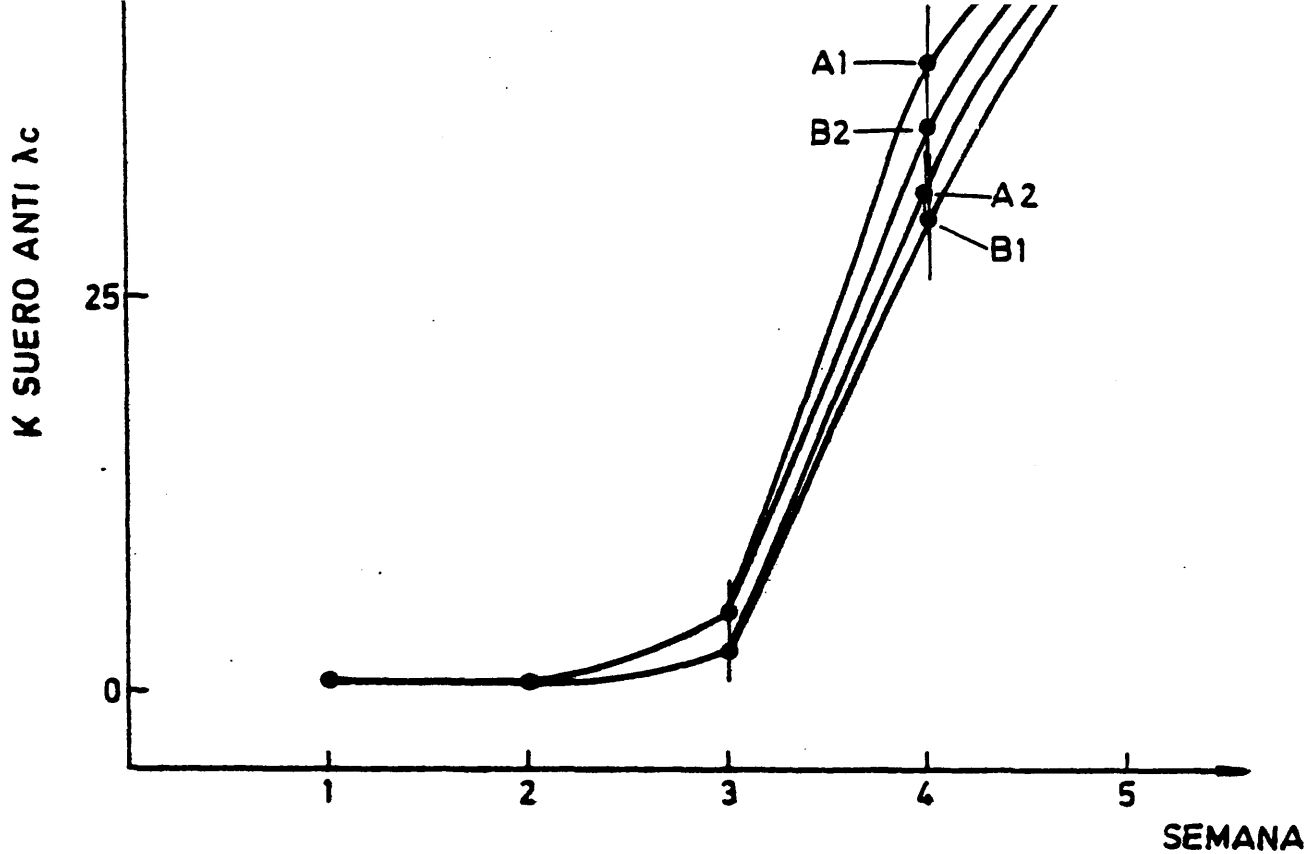


FIG. 12-1

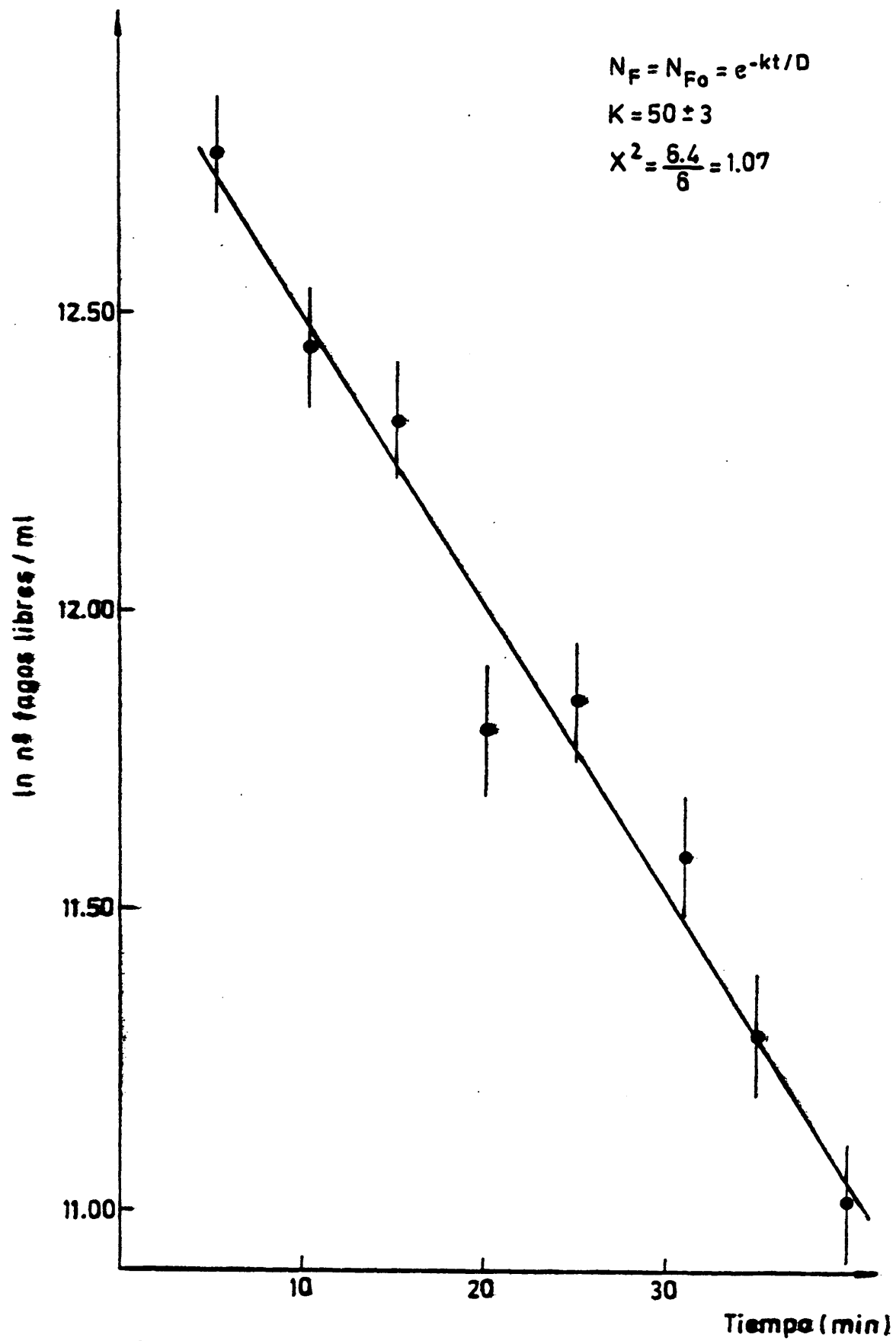


FIG. II-2

III.1 Introducción

En este capítulo presentamos una descripción matemática de los procesos de infección y lisis bacteriana por fagos, junto a un resumen aclaratorio de las hipótesis en las que dicha descripción se fundamenta. La validez experimental de las hipótesis referidas será objeto de un estudio posterior que presentaremos en el capítulo siguiente.

La interpretación algebraica de la evolución de un cultivo bacteriano en presencia de fagos requiere, como hipótesis de partida, la descripción numérica de la evolución de dicho cultivo cuando ésta sólo se debe al crecimiento bacteriano; es decir, en ausencia de fagos.

La evolución que experimenta la concentración bacteriana en un cultivo creciendo en unas condiciones precisas, presenta distintas fases descriptibles matemáticamente, de manera que en cada instante, la concentración bacteriana puede deducirse algebraicamente de concentraciones precedentes, utilizando expresiones que nos proporcionan dicha evolución y que son sólo función del número de bacterias presentes en el medio (Report JEN 437 De Vidania R., Garcés F., Dávila C.A.).

La descripción del comportamiento bacteriano en cultivos en los que se ha introducido cierto número de fagos requerirá, como ya hemos referido, la interpretación algebraica del crecimiento bacteriano en ausencia de fagos y además una descripción matemática de los procesos que intervienen en la infección y lisis de un cultivo. Los procesos a los que hacemos referencia son: el de aproximación de fagos a bacterias sin el cual la infección no puede tener lugar, el de la infección propiamente dicha y la multiplicación del fago con posterior lisis de la bacteria, sujeto, este último, a dos parámetros característicos e intrínsecos del fago: tiempo de generación y tamaño de la explosión (número de fagos promedio producido en cada bacteria).

Básicamente, los tres procesos referidos son los que modifican el comportamiento bacteriano en ausencia de fagos, e implican la considera-

ción de las hipótesis fundamentales cuya formulación hemos realizado.

De los tres, quizás la aproximación es ya intuitivamente el fenómeno que más dificultad de interpretación ofrece. El problema planteado en términos generales significa que en un determinado medio coexisten los fagos y las bacterias a distancias aleatorias, que en promedio son función de la densidad de bacterias y de fagos en dicho medio. En una primera aproximación hemos considerado estadístico el choque de fagos y bacterias, lo que tiene implicaciones en la formulación de cuál es la probabilidad de dicho choque y en consecuencia sobre los tiempos de aproximación inducidos, así como en la probabilidad de que el choque haya tenido lugar sobre una bacteria sometida a un choque precedente o sobre una en la que dicho efecto no se haya producido. Para nosotros, choque ha sido equivalente a fijación - del fago a la bacteria aunque el modelo matemático que se describe ha sido posteriormente probado ante la eventualidad de que esta suposición no sea válida. Los efectos derivados de la hipótesis de aproximación elegida han sido formulados convenientemente y su comprobación a los niveles de precisión que requieren nuestras medidas, se presentan, como ya hemos referido, en capítulos posteriores. El proceso de infección del fago a la bacteria - parece intuitivamente no tener influencia en la cinemática de la evolución de la población bacteriana, salvo claro está, en el hecho de que varios - fagos puedan adherirse e incluso inyectar su DNA a una bacteria ya infectada, antes de la explosión. Sin embargo, a efectos de cálculo del modelo hemos considerado que desde el momento que un determinado fago choca con una bacteria y se fija en ella, sólo está sometida a sucesivos choques que ya no son causa de infección. Todo ello durante un tiempo que hemos considerado en primera aproximación constante para todas las bacterias y que constituye, como luego veremos, uno de los parámetros a determinar. Biológicamente interpreta el tiempo que transcurre entre la fijación del - fago y la explosión de la bacteria con producción de nuevos fagos, lo que es generalmente conocido como tiempo de generación.

El tercer aspecto a considerar en la cinemática del proceso de lisis y a introducir en el comportamiento de un cultivo bacteriano en presencia

de fagos, es el fenómeno de la explosión por el cual, después de un tiempo de generación del fago se producen una serie de fagos, quedando la bacteria - inhabilitada como tal (lisis bacteriana). El número de los fagos procedentes de la explosión también ha sido considerado constante en primera aproximación y determinado paramétricamente del comportamiento de los cultivos bacterianos infectados; es lo que se conoce como tamaño de la explosión.

Además de las hipótesis referidas, que serán descritas detalladamente a continuación, existen otras hipótesis que llamaríamos menores también introducidas en el modelo algebraico, como son la de una potencialidad porcentuada de los fagos, la posibilidad de que los fagos se fijen también en las membranas resultantes de las explosiones bacterianas, etc., que serán expuestas después de las fundamentales.

### III.2 Descripción de la evolución de un cultivo bacteriano en ausencia de fagos. Formulación a partir de la medida de densidades ópticas

Como es sabido, la evolución de la densidad de una población bacteriana en un cultivo presenta tres etapas bien diferenciadas y que corresponden a las fases de latencia, exponencial y preestacionaria-estacionaria. En este apartado presentamos una descripción integrada de las tres zonas, que será aplicada, como veremos en el capítulo IV, a crecimientos experimentales realizados con la bacteria *E. coli* C<sub>600</sub> (Ver II.4).

Para medir las concentraciones bacterianas de forma que podamos disponer de la evolución temporal del número de bacterias/ml en un cultivo, - hemos realizado determinaciones de la absorción de luz en muestras de dicho cultivo, que es lo que llamamos densidades ópticas. Para relacionar - los valores medidos de densidades ópticas con las concentraciones bacterianas y calcular los errores correspondientes, de forma que pueda estimarse la bondad estadística de cualquier descripción paramétrica, hemos seguido el procedimiento que a continuación se explica.

1.- Se ha determinado que los errores que afectan las medidas de densi-

dad óptica son una función del valor de la densidad óptica medida y hemos calculado los parámetros que definen dicha función, escrita como la aproximación polinómica que mejor interpretaba el comportamiento de los datos experimentales.

2.- Se ha obtenido la función que relaciona los valores de la densidad óptica (DO) que se miden en un cultivo concreto, con la concentración bacteriana de dicho cultivo. Ello nos ha permitido calcular el número de bacterias (NB) por mililitro en cada cultivo, así como estimar la indeterminación en dicho número a través de la indeterminación en la densidad óptica y la función  $NB_i = f(DO_i)$  así calculada.

3.- Hemos seguido, para unas condiciones experimentales dadas (Ver capítulo II), la evolución de la concentración bacteriana con el tiempo y hemos parametrizado dicha evolución en la forma que hemos estimado más simple y correcta posible, con objeto de tener una descripción numérica de dichos procesos de crecimiento.

Describiremos ahora, sin entrar en detalles, las parametrizaciones utilizadas para las distintas zonas de la curva de crecimiento bacteriano.

### III.2.1 Curva de crecimiento bacteriano. Parametrizaciones.

En un proceso de crecimiento bacteriano es necesario distinguir varias fases. En efecto, la curva típica que relaciona el logaritmo neperiano del número de bacterias con el tiempo presenta tres partes diferentes cuya relación con las distintas fases del crecimiento está establecida (ver figura III.1). Al comienzo del crecimiento, primera parte de la curva-fase de latencia, las bacterias realizan sus primeras divisiones pero esto no ocurre simultáneamente sino que sucesivamente va aumentando el número de bacterias que entran en división. Durante esta fase, además, la duración del ciclo vital no es uniforme para todas las bacterias. La representación de dicha fase en el diagrama  $\ln(NB) \rightarrow t$  muestra un aumento progresivo de  $d(\ln(NB))/dt$  hasta alcanzar la segunda parte de la curva. Consecuentemente esta primera parte de la curva ha sido descrita como una exponencial en la que el parámetro que la define varía linealmente con el tiempo desde un va

por cero, para un tiempo cero de referencia, hasta un valor igual al que -  
corresponde al comienzo de la zona lineal ( $t_0$ ).

La evolución del número de bacterias en esta primera fase ha sido -  
descrita con la siguiente expresión:

$$N_B = N_{B_L} e^{at^2} \quad (\text{III.2.1})$$

donde  $N_B$  es el número de bacterias a tiempo  $t$ ;  $N_{B_L}$  el número inicial de -  
bacterias y  $at$  la pendiente que varía linealmente en  $t$ , siendo  $a = a_0/2t_0$ .  
 $a_0$  y  $t_0$  son respectivamente la pendiente de crecimiento de la zona lineal  
y el tiempo correspondiente al comienzo de dicha zona.

La siguiente fase de la curva es la de crecimiento exponencial en la  
que la pendiente se mantiene constante. Esta fase corresponde a tiempos en  
los que todas o la mayor parte de las bacterias se están dividiendo activa-  
mente, su metabolismo es máximo dadas las condiciones ambientales, lo que  
permite considerar constante para toda la población el tiempo de genera-  
ción bacteriano.

En esta zona la parametrización ha sido la siguiente:

$$N_B = N_{B_0} e^{a_0(t-t_0)} \quad (\text{III.2.2})$$

donde  $N_B$  y  $N_{B_0}$  son respectivamente el número de bacterias a tiempo  $t$  y -  
el número inicial de bacterias al tiempo  $t_0$  y  $a_0$  la pendiente constante -  
que está unívocamente relacionada con el tiempo de duplicación bacteriano  
( $t_d$ ) según la expresión:

$$t_d = \frac{\ln 2}{a_0} \quad (\text{III.2.3})$$

La fase siguiente comienza cuando el número de bacterias es tal que  
el medio comienza a experimentar un cambio progresivo en las condiciones -  
ambientales a causa de los productos excretados por las bacterias y al em-  
pobrecimiento de los nutrientes. En este punto comienza la parte de la cur-  
va que llamaremos estacionaria para la cual la pendiente  $d(\ln(N_B))/dt$  -  
disminuye progresivamente hasta alcanzar un valor cero o próximo a cero, -

que corresponde a la fase estacionaria de crecimiento en la que el número de bacterias se mantiene aproximadamente constante. En esta zona la parametrización utilizada ha sido:

$$\ln N_B = \ln N_{B_i} - a_0/c \left[ 1 - e^{-c(t-t_i)} \right] \quad (\text{III.2.4})$$

en donde  $N_B$  y  $N_{B_i}$  son respectivamente los números de bacterias a los tiempos  $t$  y  $t_i$  ( $t$  es variable y mayor que  $t_i$  y  $t_i$  es el tiempo para el cual comienza la tercera fase de la curva de crecimiento bacteriano),  $c$  es un parámetro que define el grado de variación diferencial del número de bacterias como función del número total de bacterias presentes en el medio. El significado de  $c$  queda claro observando la expresión para dicha variación diferencial

$$d N_B = N_B a_0 e^{-c(t-t_i)} dt \quad (\text{III.2.5})$$

Es claro que el crecimiento del número de bacterias  $dN_B$  es cada vez menor, afectado por la exponencial decreciente  $e^{-c(t-t_i)}$ , hasta hacerse cero para tiempos muy grandes.

La expresión (III.2.4) contiene la condición de que la pendiente del crecimiento exponencial para el tiempo en que comienza la tercera fase del crecimiento de bacterias coincida con la pendiente que la curva tiene en la fase exponencial y considera, como hemos referido, la degradación progresiva del cultivo.

Como ha podido verse la parametrización integrada de la curva de crecimiento bacteriano depende de cuatro parámetros  $a$ ,  $a_0$ ,  $c$  y  $t_i$ , donde  $a$  y  $a_0$  son las constantes que aparecen en el exponente de las exponenciales correspondientes a la zona de latencia y lineal,  $c$  define la variación diferencial del número de bacterias en función del número total de bacterias en la tercera zona de la curva y  $t_i$  es el tiempo en el que finaliza la fase de crecimiento exponencial.

La validez de las parametrizaciones referidas así como la descripción detallada del cálculo de las funciones que relacionan el número de bacterias y su error con la densidad óptica serán expuestos en el siguiente



te capítulo.

La información numérica obtenida sobre el crecimiento del cultivo bacteriano en ausencia de fagos será utilizada en apartados posteriores de este capítulo cuando se describa la parametrización numérica empleada para la interpretación de la evolución del número de bacterias en los procesos de lisis.

### III.3 Descripción del proceso de aproximación de fagos a bacterias. Hipótesis utilizadas

En general, el fenómeno de la adsorción de los fagos a las bacterias es tratado en la bibliografía, en una primera aproximación, como un proceso de índole estadística. Se supone que en un cultivo que está sometido a una cierta agitación para la aireación del medio, son los choques al azar los que hacen posible la fijación del fago, aunque en el proceso de adsorción que tiene lugar cuando el fago está muy cerca de la bacteria intervengan otros factores de origen físico-químico.

El ritmo de aproximación de los fagos a las bacterias viene descrito (Kay D. 1972) a través de la expresión siguiente:

$$d N_F = -K N_F N_B dt \quad (\text{III.3.1})$$

en donde  $d N_F$  es la variación de fagos libres en el medio, en un tiempo  $dt$ ,  $N_F$  y  $N_B$  son el número de fagos y bacterias por ml y  $K$  es una constante a determinar que depende de las características de la experimentación y del fago y la bacteria utilizados. La expresión indicada, tras ser integrada, nos proporciona que la variación del número de fagos libres en el medio es una función exponencial del tiempo

$$N_F = N_{F_0} e^{-K N_B t} \quad (\text{III.3.2})$$

donde  $N_{F_0}$  es el número de fagos iniciales antes del proceso de aproximación.

Como veremos en el próximo capítulo, en el que se exponen las comprobaciones experimentales de las hipótesis utilizadas en nuestro modelo, la expresión que hemos deducido para el ritmo de adsorción de fagos en nuestras condiciones experimentales es semejante a (III.3.2) pero con la diferencia de que en el exponente aparece el número de bacterias a la potencia  $1/3$  en vez de a la potencia 1 es decir:

$$N_F = N_{F_0} e^{-K N_B^{1/3} t} \quad (\text{III.3.3})$$

Un fenómeno importante y que ha sido objeto de un estudio detallado es el de la probabilidad de que la adsorción de un fago sea eficaz, en el sentido de considerar que solo el primero de los fagos que se adhieren a la pared bacteriana es responsable de la infección aunque sean varios los que inyecten su DNA en la bacteria. Es lo que hemos dado en llamar eficacia de la infección y como ha sido objeto de una formulación desarrollada por nosotros se explica en detalle en la sección siguiente. Logicamente interpreta el hecho de que no necesariamente el número de fagos - aproximado es equivalente al de bacterias infectadas.

Conviene hacer notar que la eficacia de infección es una magnitud de gran interés en los procesos de lisis en el momento en que el número de fagos es del mismo orden que el número de bacterias, y el suponerla con un valor unidad implicaría una drástica disminución del número de bacterias, en el transcurso de muy pocas generaciones (una, dos o tres, dependiendo de la concentración inicial de fagos y del momento de la infección), que no se observa sin embargo experimentalmente.

### III.3.1 Expresión desarrollada para la eficacia de infección.

Definiremos como eficacia de infección la relación entre el número de fagos que causan la infección de bacterias, en el sentido anteriormente considerado, y el número total de fagos aproximados. Es por tanto una cantidad que indica el porcentaje de fagos aproximados responsables de la infección.

Para desarrollar la expresión de la eficacia vamos a considerar un -

caso en que la aproximación de  $F$  fagos ha originado la infección de  $j$  bacterias de un total de  $B$  presentes en el medio. La eficacia de la infección en este caso concreto es  $j/F$ , el número de subconjuntos posibles de  $j$  bacterias que pueden formarse con un total de  $B$  es el número combinatorio  $\binom{B}{j}$  y el número de particiones posibles del conjunto total  $F$  de fagos en  $j$  subconjuntos, teniendo en cuenta que dichos subconjuntos pueden contener distintos fagos, es

$$\sum_{\substack{j \\ \sum_{i=1}^j \lambda_i = F}} \frac{F!}{\prod_{i=1}^j \lambda_i!}$$

en donde  $\sum_{i=1}^j \lambda_i = F$  implica que sumamos en todas las posibles particiones del total de fagos en  $j$  subconjuntos, ya que  $\lambda_i$  es el número de fagos que contiene el subconjunto  $i$ .

Si consideramos ahora todos los casos posibles de distinta eficacia  $j/F$  podemos calcular una eficacia media multiplicando el número de casos posibles para cada eficacia por el valor  $j/F$  de la eficacia y dividiendo el resultado por el total de aplicaciones posibles de  $F$  fagos en  $B$  bacterias que es  $B^F$ . La expresión que resulta para la eficacia media de la infección es:

$$\overline{Ef} = \frac{1}{B^F} \sum_{j=1}^{\min(F, B)} \frac{j}{F} F! \binom{B}{j} \sum_{\substack{j \\ \sum_{i=1}^j \lambda_i = F}} \frac{1}{\prod_{i=1}^j \lambda_i} \quad (\text{III.3.4})$$

Puede observarse que la fórmula deducida es de cálculo tedioso cuando, como en el caso de nuestro modelo, necesitamos determinarla numerosas veces durante el proceso de estimación paramétrica que será posteriormente descrito. Consecuentemente es necesaria su simplificación, para lo cual se ha realizado la sumación de la expresión (III.3.4) de la forma siguiente. Si consideramos

$$\sum_{\substack{j \\ \sum_{i=1}^j \lambda_i = F}} \frac{1}{\prod_{i=1}^j \lambda_i!} = f(j)$$

y sustituimos en la expresión (III.3.4) tendremos

$$\overline{Ef} = \frac{1}{B^F} \sum_{j=1}^{\min(F,B)} \frac{j}{F} F! \binom{B}{j} f(j)$$

en la que efectuando las transformaciones siguientes

$$\overline{Ef} = \frac{F!}{B^F F} \sum_{j=1}^{\min(B,F)} j \binom{B}{j} f(j) = \frac{F!}{B^F F} \sum_{j=1}^B j \frac{B!}{(B-j)!j!} f(j) =$$

$$= \frac{F!}{B^F F} \sum_{j=1}^B \frac{B(B-1)!}{(B-j)!(j-1)!} f(j) = \frac{F!}{B^F F} \sum_{j=1}^B B \binom{B-1}{j-1} f(j)$$

se obtiene la expresión

$$\frac{F! B}{B^F F} \sum_{j=1}^B \binom{B-1}{j-1} f(j)$$

que es de más fácil manejo que III.3.4. Además, si consideramos la siguiente propiedad de los números combinatorios

$$\binom{B}{j} = \binom{B-1}{j-1} + \binom{B-1}{j}$$

podemos pasar a la expresión

$$\overline{Ef} = \frac{F!}{B^F} \frac{B}{F} \sum_{j=1}^B \binom{B}{j} f(j) - \sum_{j=1}^B \binom{B-1}{j} f(j)$$

en la que el número combinatorio de la segunda sumatoria podría presentar alguna ambigüedad cuando  $j$  es igual a  $B$ , en caso de que fuera posible, ya que tendríamos  $\binom{B-1}{B}$  que no está definido. Sin embargo esta ambigüedad no existe ya que tendríamos

$$\binom{B-1}{B-1} = \binom{B}{B} = 1$$

Utilizando ahora la siguiente condición de normalización:

$$\frac{F!}{B^F} \sum_{j=1}^B \binom{B}{j} f(j) = 1$$

llegamos a la expresión

$$\overline{Ef} = \frac{F!}{B^F} \frac{B}{F} \left( \frac{B^F}{F!} - \frac{(B-1)^F}{F!} \right)$$

en la que operando obtenemos:

$$\overline{Ef} = \frac{B}{F} \left( 1 - \left( 1 - \frac{1}{B} \right)^F \right) \quad (\text{III.3.5})$$

Puede observarse que la expresión anterior es extremadamente sencilla y su cálculo inmediato conociendo el número de bacterias  $B$  y el de fagos  $F$ , que a ellas se aproximan. Es también interesante notar que proporciona valores drásticamente diferentes de la unidad, cuando el número de fagos es al menos comparable con el de bacterias. Este efecto tiene una gran influencia en la evolución del proceso de lisis.

Las hipótesis esenciales sobre las que se fundamenta la expresión -

(III.3.5) son las siguientes

1 - El proceso de aproximación de fagos a bacterias es puramente aleatorio de forma que un fago puede adherirse a una bacteria ya infectada o a una que no lo ha sido con probabilidad similar.

2 - Todos los fagos se adhieren a las bacterias de acuerdo con una dependencia temporal que ha sido descrita en el apartado (III.3).

3 - Sólo consideramos eficaz, por cada bacteria infectada, un único fago, aunque a una bacteria se le puedan adherir varios fagos.

La expresión (III.3.5) supone además que los fagos sólo se adhieren a las paredes bacterianas y no considera la posibilidad de que se adhieran a las membranas producto de las explosiones bacterianas, tras el proceso de lisis. Si consideramos este efecto como posible, el cálculo de la eficacia es diferente y se hace necesario modificar la expresión deducida en la forma siguiente

$$Ef' = \frac{B}{F} \left( 1 - \left( 1 - \frac{1}{B+M} \right)^F \right) \quad (III.3.6)$$

donde  $Ef'$  es la eficacia modificada considerando que los fagos ( $F$ ) pueden adherirse a bacterias ( $B$ ) y membranas ( $M$ ) con igual probabilidad. Esta expresión proviene de considerar que el término  $B$  de la expresión III.3.5 es  $B+M$  pero que, evidentemente, sólo las bacterias ( $B$ ) son susceptibles de ser infectadas<sup>(1)</sup>.

Referiremos en mayor detalle esta modificación cuando describamos las hipótesis adicionales consideradas en el modelo, que serán descritas en el apartado (III.5).

Las modificaciones esenciales que la introducción de la eficacia aporta a los cálculos, que sobre la evolución del número de bacterias durante la lisis proporciona el modelo, requieren que sean comprobadas en lo

posible las hipótesis utilizadas. Para ello hemos realizado una experimentación independiente que será descrita en el capítulo IV y que confirma - las predicciones que la expresión (III.3.5) proporciona para la eficacia - de infección (en condiciones experimentales en ausencia de membranas).

#### III.4 Descripción numérica del proceso de lisis bacteriana por fagos

El modelo numérico que exponemos a continuación pretende describir la evolución de un cultivo bacteriano infectado con fagos, entendiendo por descripción el proporcionar valores en acuerdo con las medidas experimentales para el número de bacterias y el número de fagos presentes en el medio en función del tiempo.

Para ello se introducen como datos los siguientes:

1 - La descripción matemática de la curva de crecimiento de bacterias - en ausencia de fagos, que como sabemos tiene tres partes analíticamente - bien diferenciadas. Los parámetros que dicha descripción necesita se obtienen de ajustes a las curvas de crecimiento bacteriano de los cultivos sin infectar.

2 - El tiempo al que se realiza la infección, relativo a los tiempos en los que se ha medido la densidad óptica, lo que permite conocer el valor - del número de bacterias, así como el número de fagos introducidos en el momento de la infección.

3 - Curvas de densidad óptica medida en función del tiempo. Para cultivos infectados en distintos momentos y con diferentes multiplicidades de - infección.

En esencia, la descripción numérica que presentamos pretende reproducir el proceso de lisis en función de tres parámetros que se consideran - constantes con el tiempo:

- 1.- Tiempo de generación del fago ( $t_g$ )
- 2.- Tamaño de la explosión bacteriana ( $t_{exp}$ )
- 3.- Parámetro representativo de la aproximación de fagos a bacterias.

Como veremos más adelante, el modelo ha sido posteriormente sofisticado introduciendo nuevos parámetros cuya significación para el proceso se especificará. A continuación se describe como ha sido calculado el número de bacterias, que es lo que se compara con los valores experimentales proporcionados por las curvas de lisis (ver Fig. III.2).

a.- Para cualquier tiempo  $t$ , consideramos un intervalo de tiempo  $t - \Delta t/2$ ,  $t + \Delta t/2$  y calculamos el número de bacterias que existe en este intervalo - en función de las existentes en el intervalo inmediatamente anterior.  $\Delta t$  es la anchura temporal del intervalo, que como se verá ha sido estimada - en nuestro modelo como la idónea para no perder precisión en las predicciones relativas al cálculo del número de bacterias y de fagos, consumiendo a su vez el menor tiempo posible de ordenador en la estimación.

b.- El incremento correspondiente al número de bacterias en dicho intervalo centrado en torno al tiempo  $t$  se calcula en función del número de bacterias existentes en el intervalo precedente utilizando la expresión matemática que describe las curvas de crecimiento bacteriano dependiendo, claro está, de la zona de la curva a que correspondan.

c.- El decremento del número de bacterias (el número de bacterias que explotan) para el intervalo  $\Delta t$  en torno al tiempo  $t$ , se calcula como el número de fagos libres que no han sido adsorbidos, en intervalos precedentes al - correspondiente a  $t - t_g$ , y que se adsorben en ese  $\Delta t$ , modificado por el - factor que tiene en cuenta la eficacia de infección.

La expresión utilizada es por lo tanto

$$N_B(t) = N_B(t - \Delta t) + \Delta N_B(t) - \Delta' N_B(t) \quad (\text{III.4.1})$$



en donde  $N_B(t)$  indica el número de bacterias en el tiempo  $t$ .  $\Delta N_B(t)$  el incremento descrito en el apartado b y  $\Delta' N_B(t)$  el decremento descrito en el apartado c. La determinación del incremento del número de bacterias dependiendo de la zona de la curva de crecimiento a que corresponda el tiempo - es el siguiente

1ª Zona:

$$\Delta N_B(t) = 2 N_B(t-1) \sqrt{\ln(N_B(t-1)/N_{B_0})} a \Delta t \quad (\text{III.4.2})$$

2ª Zona:

$$\Delta N_B(t) = N_B(t-1) a_0 \Delta t \quad (\text{III.4.3})$$

3ª Zona:

$$\Delta \ln N_B(t) = a_0 \left[ 1 - c/a_0 (\ln N_B - \ln N_{B_i}) \right] \Delta t \quad (\text{III.4.4})$$

en donde  $a$ ,  $a_0$ ,  $c$  y  $t_i$  son las constantes de las expresiones que definen - las distintas zonas de la curva de crecimiento y cuyo significado se describió en (III.2.1) (ver Fig. III.1). El término  $\Delta' N_B(t)$ , que proporciona la disminución en el número de bacterias debido a las explosiones, es más complejo y su parametrización es la esencia de nuestra descripción del proceso de lisis. De acuerdo con nuestras hipótesis y suponiendo que el tiempo de generación del fago es estrictamente constante, es decir, sin dispersión estadística observable,  $\Delta' N_B(t)$  contiene el número de bacterias a - las que se les ha adherido al menos un fago en un tiempo  $t-t_g$  ( $t_g$  = tiempo de generación del fago). Dicha variación en el número de bacterias dependerá evidentemente del total de bacterias y fagos presentes en el medio y - también, por supuesto, de cómo tiene lugar el proceso de aproximación del fago a la bacteria.

Como ya hemos referido según la hipótesis estadística la aproximación del fago a la bacteria tiene lugar de acuerdo con la expresión

$$\frac{d N_F}{dt} = -K N_B(t) N_F(t) \quad (\text{III.4.5})$$

$F(t) = \frac{B(t)}{B(t)}$   
 medio a tiempo  $t$ . La expresión anterior, que nuestros resultados (IV.3) parecen demostrar incorrecta en nuestras condiciones experimentales, se ha modificado (la dependencia en  $N_B(t)$  debe ser sustituida por  $N_B^{1/3}(t)$ ) e indica que los fagos que restan en el medio a un tiempo  $t_2$ , después de ser introducidos a un tiempo  $t_1$  son

$$N_{F_{t_2}} = N_{F_{t_1}} e^{-K N_B^{1/3}(t_2 - t_1)} \quad (\text{III.4.6})$$

En consecuencia, la expresión utilizada en los cálculos que realiza el modelo ha sido la III.4.6 con la hipótesis de que en el rango  $(t_2 - t_1)$  el número de bacterias se ha mantenido aproximadamente constante. Como hemos indicado, puesto que a una bacteria puede aproximarse mas de un fago no es posible considerar que el número de fagos aproximado es igual al de bacterias infectadas. Ello nos ha obligado a considerar una eficacia de infección ( $E_f$ ) a la hora de calcular las bacterias infectadas a causa de los fagos que se van adhiriendo.

El modelo calcula  $\Delta' N_B(t)$  como sumatoria de todas las infecciones eficaces habidas en un intervalo  $\Delta t$ , para un tiempo  $t - t_g$ , ocasionadas por fagos libres en cada intervalo  $\Delta t$  anterior al tiempo  $t - t_g$

$$\Delta' N_B(t) = \sum_{i=1}^N N_{F_i} E_{f_i} e^{-K N_{B_i}^{1/3}(t - t_g - t_i)} K N_{B(t - t_g)}^{1/3} \Delta t \quad (\text{III.4.7})$$

en donde  $E_f$  depende evidentemente del número de fagos y bacterias presentes en el medio al tiempo correspondiente a  $(t - t_g)$  (y del número de membranas si éstas se consideran en el cálculo de dicha eficacia).

De lo expuesto como método de cálculo se deduce que es necesario determinar el número de fagos producidos en cada intervalo salvo el primero, en el que consideramos el número de fagos introducido. Los fagos producidos en cada intervalo  $\Delta t$  son los que provienen de las bacterias que explotan en dicho intervalo; y el número de bacterias que explotan lo conocemos de lo expuesto anteriormente porque es  $\Delta' N_B(t)$  <sup>(2)</sup>. El número de fagos que se producen en cada intervalo de tiempo será pues  $\Delta' N_B(t) \cdot t_{\text{exp}}$  en

donde  $t_{exp}$  es el tamaño de la explosión que en el modelo se ha supuesto - constante (igual al tamaño medio de explosión).

Con las expresiones referidas y mediante un método iterativo es posible calcular el número de bacterias presentes en el medio en cada instante para un valor dado de los parámetros externos y por lo tanto es posible - comparar los valores proporcionados por el modelo y los obtenidos por medida durante el proceso de la lisis. Esta comparación permite, utilizando - uno de los estimadores estadísticos normales, conocer los valores de los - parámetros que optimizan la descripción de las curvas de lisis medidas. No obstante y antes de entrar en la descripción matemática del estimador utilizado describiremos como se ha calculado numéricamente la eficacia de la infección en función del tiempo, puesto que es una de las variables que el modelo necesita. En la sección (III.3.1) hemos deducido que la expresión - de la eficacia de la infección en un momento  $t$ , cuando existen en el medio un número de bacterias  $B$  y de fagos  $F$ , es

$$Ef(t) = \frac{B(t)}{F(t)} \left( 1 - \left( 1 - \frac{1}{B(t)} \right)^{F(t)} \right) \quad (III.4.8)$$

$Ef(t)$  vendrá modificada de acuerdo con la expresión (III.3.6) si se considera la posibilidad de adhesión de los fagos a las membranas. El número de bacterias  $B(t)$  se conoce en cada instante del proceso de lisis por medio - de la expresión (III.4.1), pero el número de fagos  $F(t)$  es necesario calcularlo para cada uno de los intervalos en que se necesita conocer la efica-cia.  $F(t)$  ha sido considerado como el número de fagos libres que se apro-ximan a bacterias en el momento de estimar la eficacia y su cálculo se - realiza a partir de los números de fagos producidos en intervalos anteriores y que aún no se han adherido a las bacterias. La expresión utilizada ha sido

$$F(t) = \sum_{j=0}^{n-1} F(t)_j e^{-K B(t)_j^{1/3} (t-t_j)} K N_{B_i}^{1/3} \Delta t \quad (III.4.9)$$

en donde  $F(t)_j$  es el número de fagos producido en cada intervalo y la expo- nencial describe la desaparición de dichos fagos por adsorción con el tiem

po. La sumatoria está extendida a todos los intervalos anteriores al intervalo  $n$  que es en el que pretendemos calcular la eficacia.

Utilizando las expresiones anteriores (III.4.1 y III.4.9) es posible calcular en cualquier intervalo  $\Delta t$  centrado en un tiempo  $t$  el número de bacterias presentes en el medio así como el número de fagos que bien por estar libres, es decir no adheridos a bacterias o membranas (si se considera la posibilidad) bien por haberse adherido a membranas o bacterias ya infectadas, constituyen el rendimiento en fagos obtenido hasta ese instante  $t$ , por la infección y lisis de las bacterias. Es por lo tanto posible comparar los valores que proporciona el modelo para distintos sistemas de parámetros iniciales, en cuanto a número de bacterias y de fagos libres se refiere, con los medidos experimentalmente a través de determinaciones de densidades ópticas o de contajes de placas de lisis.

En los apartados siguientes describiremos algunas hipótesis adicionales que han sido ensayadas en la comparación del modelo con los datos experimentales, así como una exposición de los métodos numéricos utilizados para elaborar las predicciones del modelo y estimar los valores óptimos de los parámetros que en él intervienen.

### III.5 Otras hipótesis consideradas en la descripción numérica de la lisis

En las expresiones anteriores que traducen numéricamente algunas ideas básicas sobre la cinemática del proceso de lisis, existen aproximaciones que no han sido detalladamente comprobadas y que pueden afectar a la interpretación de los datos experimentales. Todas aquellas que a nuestro modo de ver podían modificar sustancialmente los cálculos han sido estudiadas individualmente, observando si los datos experimentales requerían de las modificaciones que su consideración implicaba. Algunas de ellas han sido tenidas en cuenta en nuestros ajustes finales del modelo. Describiremos a continuación las más importantes.

a) Potencialidad de fagos.- En el proceso numérico de infección descrito hemos considerado que todos los fagos producidos en las explosiones de las

bacterias eran susceptibles, después de adherirse a las bacterias, de provocar su infección (fagos potentes). Sin embargo, esta hipótesis no está suficientemente comprobada en nuestras condiciones experimentales y, en consecuencia, la expresión (III.4.3) ha de ser sustituida por

$$Ef' = Ef \times \alpha$$

(III.5.1)

en donde  $Ef$  se determina utilizando para  $F(t)$  el número de fagos potentes libres en el intervalo considerado. El factor  $\alpha$  indica la fracción de fagos producidos que son capaces de infectar.

La aproximación referida, que finalmente tiene en cuenta la posibilidad de que no todos los fagos tengan intrínsecamente capacidad de originar la lisis de las bacterias ha sido ensayada en varios de los ajustes que serán descritos en el capítulo V. No se ha realizado experimentación parcial para comprobar la validez de los resultados obtenidos para  $\alpha$  con el modelo numérico descrito en el apartado anterior. Su validez se discute - en el capítulo V.

b) Desprendimiento de fagos.- Durante el proceso de crecimiento infección y lisis, los cultivos bacterianos han estado sometidos a una cierta agitación (cap. II) lo que podría hacer posible que los fagos no responsables - de la lisis de bacterias, es decir los no eficaces, se desprendan de las - paredes bacterianas, con lo que pasarían a engrosar el grupo de fagos que hemos considerado libres y en base al cual se calcula la eficacia de infección. Esta posibilidad es necesario admitirla, ya que como expondremos en el próximo capítulo en relación con las comprobaciones experimentales referentes al proceso de aproximación, agitaciones más bruscas dan lugar al - despegue de fagos (ver cap. I pág. 9 ). Consecuentemente, y a pesar de que el movimiento al que se somete el cultivo es más suave que el que ha dado origen al efecto indicado en el estudio de la aproximación, hemos considerado la posibilidad de que un desprendimiento similar tuviera lugar durante el proceso de la lisis. Para ello hemos introducido eventualmente, en - algunos ajustes realizados con el modelo, una tasa temporal de desprendimiento  $\beta(t)$  fraccionaria, que ha sido determinada al mismo tiempo que el resto de los parámetros. La validez de la hipótesis indicada sólo ha sido objeto de comprobación utilizando la bondad de la descripción estadística

de la evolución del número de bacterias en algunos ajustes realizados por el modelo y no se ha llevado a cabo experimentación parcial adicional para su comprobación.

c) Fijación de fagos en membranas procedentes de las explosiones bacterianas.- En los cultivos bacterianos infectados coexisten al mismo tiempo bacterias infectadas y sin infectar, fagos libres, fagos adosados a bacterias ya infectadas y membranas procedentes de las explosiones bacterianas. Es evidente que el número de membranas aumenta con el tiempo de forma semejante a la exponencial como posteriormente se deduce del resultado de los ajustes.

Si los fagos libres presentes en un momento cualquiera del crecimiento tienen la posibilidad de adherirse a las membranas, la eficacia de la infección disminuye tanto más cuanto mayor sea el número de membranas existentes. Para considerar esta posibilidad hemos modificado la expresión (III.3.6), que proporciona el valor de la eficacia de infección considerando las membranas, introduciendo un nuevo parámetro  $\gamma$  en la forma siguiente

$$Ef' = \frac{B}{F} \left( 1 - \left( 1 - \frac{1}{B + \gamma M} \right)^F \right) \quad (III.5.2)$$

Además todas las expresiones que consideran la aproximación de fagos libres incluyen la posibilidad de que lo hagan a membranas y no solo a bacterias.

El parámetro  $\gamma$  ha sido determinado, para alguno de los ajustes realizados con el modelo descrito en (III.4), por estimación paramétrica, al igual que el resto de las variables y  $M$  es el número de membranas presentes en el medio. No hemos realizado comprobación experimental adicional de los valores obtenidos para  $\gamma$  (salvo una determinación cualitativa, que referiremos en el capítulo V) y su validez ha sido extrapolada de las comprobaciones que con éxito se han realizado de los valores obtenidos para el resto de los parámetros involucrados en nuestra descripción numérica de la lisis.

d) Corrección por absorción de luz de las membranas.- Los valores del número de bacterias determinados a diferentes tiempos durante el proceso de lisis de un cultivo se han obtenido de la misma forma que en los cultivos sin infectar, es decir, utilizando la expresión (IV.2.1) que relaciona la absorción de luz de una muestra del cultivo con el número de bacterias.

Sin embargo podría ocurrir que después de la infección, una fracción de la densidad óptica medida fuera debida a la absorción de luz de las membranas producidas tras la explosión de las bacterias infectadas. En principio y - dado que desconocemos el tamaño y forma de tales restos celulares, dicha - fracción es desconocida, pero su consideración en los ajustes puede variar sensiblemente los resultados que el modelo proporciona. En consecuencia he - mos introducido, en la comparación de las predicciones del modelo con los números de bacterias obtenidos experimentalmente a partir de las densida - des ópticas medidas, un parámetro  $\delta$  que significa la relación de intensi - dades luminosas absorbidas por membranas y bacterias. Dicho parámetro  $\delta$  ha sido determinado, al igual que los anteriores, por ajuste del modelo - teórico a la evolución de las densidades bacterianas en los cultivos estu - diados. En principio, su validez puede estimarse como extrapolación de la validez de nuestras determinaciones de otros parámetros que integran el mo - delo.

e) Decalajes temporales entre las diferentes curvas de lisis medidas.- El modelo propuesto pretende describir la evolución de cualquier cultivo bac - teriano en términos paramétricos independientemente del momento y multipli - cidad de infección utilizados. Sin embargo, sucede que la evolución de los distintos cultivos seguidos no necesariamente tiene el mismo origen tempo - ral. Es decir, existe un decaje entre los tiempos para los que se ha me - dido la densidad óptica entre las distintas curvas de lisis y de todas - ellas respecto de la curva de crecimiento bacteriano de referencia que per - mite calcular los incrementos de bacterias en cada instante. Con objeto de homogeneizar los datos experimentales medidos en todas las curvas de lisis que hemos considerado, se ha introducido un sistema de parámetros  $\rho_j$ , uno por cada curva de lisis, con el cual se ha corregido cada uno de los tiem - pos en los que se ha determinado el número de bacterias, así como el tiem - po de infección, y se ha permitido su determinación por ajuste durante el proceso de estimación paramétrica. En principio y puesto que las condicio - nes experimentales han sido similares en todos los cultivos cuyo seguimien - to se ha realizado, los ajustes se han iniciado utilizando un único paráme - tro  $\rho$  para todos ellos y posteriormente, en una segunda aproximación, se ha permitido su variación individualizada cultivo por cultivo.

Los parámetros  $p_j$  no tienen significado biológico alguno y sólo son un instrumento matemático que sirve para homogeneizar los datos experimentales. Han sido considerados no sólo en la descripción de las curvas de lisis sino también en la caracterización de la curva de crecimiento de bacterias, indispensables para la aplicación del modelo desarrollado.

f) Determinación del parámetro de aproximación.- A pesar de que el proceso de aproximación ha sido descrito y comprobado independientemente del modelo interpretativo de la lisis, el parámetro que define dicha aproximación, de acuerdo con la formulación utilizada, ha sido determinado independientemente en los ajustes con el modelo que describe la lisis y en la experimentación adicional para estudiar el proceso de aproximación. Su comparación ha permitido, como veremos en el capítulo V, una evaluación de la veracidad interpretativa de nuestra descripción numérica.

### III.6 Métodos numéricos utilizados

El modelo explicado ha sido llevado a cabo mediante la confección de un programa que utilizando el lenguaje FORTRAN V ha aprovechado las facilidades del sistema de la UNIVAC 1100/81 del Centro de Cálculo de la Junta de Energía Nuclear (J.E.N.) así como la librería de programas del Grupo de Altas Energías de la J.E.N. En esencia, hemos utilizado un programa numérico de minimización para insertar, como función a minimizar, un estimador  $\chi^2$  que permite la determinación de los valores de los parámetros del modelo que proporcionan una mayor compatibilidad entre las predicciones teóricas, referentes a la evolución del número de bacterias o de fagos, con las medidas experimentales realizadas.

Como hemos descrito, nuestras determinaciones experimentales nos han permitido conocer en una serie  $j$  de cultivos bacterianos infectados con diferentes números de fagos y a distintos tiempos, el número de bacterias  $B_{ij}$  presentes en el medio a tiempos  $t_{ij}$ , así como el número de fagos  $F_j$ , rendimientos del proceso de lisis en cada uno de los cultivos estudiados.

La determinación de los parámetros se ha realizado utilizando únicamente la información sobre el número de bacterias.



$$\chi^2 = \sum_{j=1}^N \left( \sum_{i=1}^{n_j} \frac{(B_{ij} - t_{ij})^2}{\Delta B_{ij}^2} \right) \quad (\text{III.6.1})$$

en donde  $B_{ij}$  y  $\Delta B_{ij}$  son, respectivamente, el número teórico de bacterias predicho para cada tiempo  $t_{ij}$ , para cada uno de los procesos de lisis  $j$  y los errores experimentales en las determinaciones de los números de bacterias  $B_{ij}$ .  $N$  y  $n_j$  son respectivamente el número de cultivos seguidos y el número de puntos experimentales para los que se ha medido la densidad bacteriana por cultivo  $j$ .

El programa puede ser modificado para incluir información sobre el número de fagos presentes en el medio a un tiempo  $t$  determinado de la lisis sin más que añadir al  $\chi^2$  un término:

$$\chi^2 = \epsilon \frac{E_j - P_j}{F_j^2}$$

En donde  $F_j$  y  $P_j$  son los rendimientos en fagos experimental y teórico respectivamente y  $\epsilon$  un parámetro que permite dar más peso a la información sobre los fagos o sobre las bacterias según deseo del usuario. Normalmente, sin embargo, y para los resultados presentados en esta memoria, no hemos utilizado la facilidad descrita a causa de que la imprecisión obtenida en la estimación del rendimiento en fagos es mucho mayor que en la determinación del número de bacterias e incluye, además, un único punto por curva de lisis. La información adicional que se proporciona al programa de ajuste es consecuentemente muy pequeña.

Como ya hemos introducido, se ha utilizado un programa de minimización numérica MINUIT que utilizando una subrutina auxiliar escrita por el usuario permite encontrar los valores de los parámetros que hacen extremo el valor de una función, en nuestro caso el  $\chi^2$ . La subrutina FCN tiene -

una serie de argumentos que permiten pasar información del programa MINUIT a la subrutina del usuario y viceversa. De entre ellos los que hemos utilizado son NPAR, X, F, IFLAG. El significado de cada uno de esos argumentos es el siguiente:

NPAR - Número de parámetros utilizado en la minimización

X - Vector dimensionado al número de parámetros y que contiene en cada una de sus componentes el valor actual del correspondiente parámetro en el momento concreto de la minimización.

F - Valor de la función correspondiente a los valores de parámetros  $X(j)$

IFLAG - Es un indicador que permite conocer al usuario el estado del proceso de minimización.

En concreto, cuando IFLAG vale 1 significa que se ha entrado en la subrutina FCN por primera vez y que la minimización aún no ha comenzado. Esta fase permite al usuario la lectura de todos los datos iniciales imprescindibles junto con los valores de los parámetros, para calcular el valor de la función a minimizar.

Cuando IFLAG vale 2 ó 4, el usuario conoce que se encuentra en medio del proceso de minimización y, por tanto, no es necesaria ni la lectura de los datos iniciales ni la elaboración de predicciones correspondientes al mínimo.

Si IFLAG vale 3 significa que el proceso de minimización ha terminado habiéndose encontrado el mínimo que se buscaba y es el momento de elaborar predicciones adicionales utilizando los valores óptimos de los parámetros.

El programa MINUIT trabaja de forma que en función de unos valores iniciales de los parámetros, proporcionados en forma de datos típicos del programa, así como de las indeterminaciones que el usuario estima tienen dichos valores iniciales respecto del óptimo, va variando los valores de tales parámetros en cantidades que corresponden a distancias razonables estimadas del mínimo y estudiando al mismo tiempo el comportamiento de la

función cuyo extremo se desea calcular. El procedimiento numérico para converger en el mínimo se explica detalladamente en F. James (1976). En cada uno de los pasos de la minimización el programa hace una llamada a la subrutina FCN para que calcule el valor de la función  $\chi^2$  utilizando los valores de los parámetros propuestos por el programa. La minimización termina cuando la distancia al mínimo es inferior a una tolerancia dato del programa. La tolerancia típica que ha sido la utilizada en nuestras minimizaciones es de 0.1.

### III.6.1 Descripción de la metodología de cálculo seguida en la subrutina FCN de usuario del programa MINUIT.

La subrutina FCN escrita, cuyo listado se adjunta en el apéndice 1 - junto con las otras subrutinas desarrolladas. Tiene tres fases diferentes que se corresponden a las descritas al referirnos a los distintos valores del indicador IFLAG. En la primera de ellas se leen de ficheros de datos las características de la curva de crecimiento de bacterias, los datos experimentales que definen los distintos cultivos (densidades ópticas, tiempos y rendimientos en fagos), así como las características del proceso de infección (momento y multiplicidad), cultivo por cultivo.

En la segunda de las fases se determinan para cada sistema de parámetros  $X$  proporcionados por el programa, las predicciones teóricas sobre el número de bacterias para cada tiempo  $t_{ij}$  del cultivo  $j$  así como sobre el rendimiento en fagos de cada uno de los cultivos, y se calcula el valor de la función  $\chi^2$ . Esta determinación se realiza utilizando un sistema de subrutinas auxiliares desarrolladas por nosotros mismos, así como varias funciones de la librería de programas del Grupo de Altas Energías, en particular aquellas que realizan una integración numérica por el método de Gauss de una función cuyos valores para cada punto que se necesite de la variable de integración pueden ser calculados. Dichas subrutinas nos han permitido estimar los valores de las sumatorias que aparecen en las expresiones (III.4.7 y III.4.9) y que nos proporcionan las correcciones a los números de bacterias y de fagos, intervalo por intervalo.

Un estudio adicional que ha sido necesario realizar dado el gran consumo de tiempo de proceso del programa ha consistido en determinar el número mínimo de puntos que la subrutina de integración había de utilizar para proporcionarnos precisiones inferiores en el número de fagos y bacterias a las esperadas, de forma que el tiempo de ejecución del programa fuese el mínimo imprescindible. El estudio se ha llevado a cabo analizando las fluctuaciones en las determinaciones teóricas del número de bacterias y de fagos en función del número de puntos de integración. El resultado indica que con 5 puntos por integración se consiguen las precisiones requeridas.

### III.7 Resumen de características, parámetros y predicciones del modelo de lisis

En los apartados precedentes del presente capítulo hemos descrito - las hipótesis en las que se ha fundamentado el modelo numérico de la lisis, así como las formulaciones utilizadas para interpretar los aspectos parciales de la cinemática del proceso. En esencia, las hipótesis utilizadas han sido las siguientes:

- a) El crecimiento del número de bacterias en función del tiempo, en un cultivo bacteriano en ausencia de fagos puede ser interpretado utilizando las tres expresiones siguientes:

$$N_B = N_{B_L} e^{at^2} \quad (\text{III.7.1})$$

$$N_B = N_{B_0} e^{ao(t-t_0)} \quad (\text{III.7.2})$$

$$\ln N_B = \ln N_{B_i} + ao/c \left[ 1 - e^{-c(t-t_i)} \right] \quad (\text{III.7.3})$$

donde el significado de cada una de las variables ha sido descrito en la sección (III.1.1). La primera expresión interpreta la zona de latencia, la segunda la zona de crecimiento exponencial y la tercera interpreta la zona estacionaria y aquella otra previa a la estacionaria y -

posterior a la exponencial.

- b) Cuando se introducen fagos en un cultivo bacteriano, las bacterias en él existentes se ven afectadas por procesos de lisis que producen nuevos fagos, los cuales a su vez infectan nuevas bacterias en el cultivo y así sucesivamente. En este proceso dos fenómenos han necesitado de parametrización con objeto de poder describir numéricamente la cinemática seguida por el cultivo:

- b1.- El proceso de aproximación de fagos a bacterias cuya formulación ha sido la siguiente:

$$N_F = N_{F_0} e^{-K N_B^{1/3} t} \quad (\text{III.7.4})$$

- b2.- La eficacia de la aproximación de fagos a bacterias, entendiendo como tal el porcentaje de fagos que ha cumplido la tarea de infectar las bacterias. El proceso de aproximación ha sido considerado estadístico y la expresión utilizada para interpretar la eficacia ha sido la siguiente:

$$Ef(t) = \frac{B(t)}{F(t)} \left( 1 - \left( 1 - \frac{1}{B(t)} \right)^{F(t)} \right) \quad (\text{III.7.5})$$

o

$$Ef'(t) = \frac{B(t)}{F(t)} \left( 1 - \left( 1 - \frac{1}{B(t) + M(t)} \right)^{F(t)} \right)$$

si se considera la posibilidad de fijación del fago a membranas. El significado de las variables utilizadas en (III.7.4) y (III.7.5) ha sido descrito en los apartados (III.3) y (III.3.1) del presente capítulo.

- c) El número de bacterias presentes en el cultivo y que contribuyen a la intensidad luminosa absorbida que determinan las densidades ópticas medidas, ha sido calculada, en cada intervalo  $\Delta t$  en torno a un tiempo  $t$  utilizando la expresión siguiente:

$$N_B(t) = N_B(t-\Delta t) + N_B(t) - \Delta N_B(t) \quad (\text{III.7.6})$$

en donde el incremento del número de bacterias es debido a la duplicación de aquellas no infectadas y el decremento  $\Delta N_B(t)$  se ha estimado a partir de los números de bacterias y eficacias de infección en intervalos precedentes utilizando la expresión (III.4.7).

En todos los cálculos el tiempo de generación del fago así como el tamaño de la explosión de la bacteria han sido considerados constantes.

- d) Hemos ensayado hipótesis adicionales que han sido probadas mediante la introducción eventual de parámetros y la comparación de los  $\chi^2$  correspondientes a las mejores interpretaciones estadísticas de los datos. Estas hipótesis se han referido a una potencialidad porcentual de los fagos, a un posible desprendimiento de fagos adsorbidos durante la lisis, a correcciones por absorción de luz de las membranas, así como a la introducción de decalajes temporales que permitan fijar un mismo origen para cada una de las curvas de lisis utilizadas en la comprobación del modelo.

En relación con los parámetros que el modelo permite determinar mediante la búsqueda, por el método de minimización numérica referido, de la descripción óptima de las curvas de lisis experimentales, son los siguientes:

- 1.- Tiempo de generación del fago.
- 2.- Tamaño de la explosión bacteriana.
- 3.- El parámetro de aproximación de fagos a bacterias.
- 4.- Eventualmente los parámetros que necesita la consideración de alguna de las hipótesis adicionales descrita en (III.5).
- 5.- Los decalajes para homogeneizar el origen de tiempos de las curvas experimentales de lisis.

Los ajustes realizados con el programa MINUIT han permitido determi-

una de las predicciones del modelo son dichos valores, que han sido comprobados mediante una experimentación parcial independiente. Los resultados se presentan en el capítulo correspondiente.

Otra de las predicciones del modelo numérico consiste en, una vez de terminados los parámetros óptimos, proporcionar el número de fagos rendimiento de la lisis para cada tiempo y en particular al final del proceso, es decir, cuando se estabiliza el aumento del número de fagos.

El apéndice I presenta un listado de las subrutinas que ha sido necesario desarrollar e incluir en el programa MINUIT para realizar los cálculos referidos. El listado incluye, sentencia por sentencia, el contenido de las subrutinas, pero no incluye las propias del programa de minimización MINUIT, ni las sentencias para compilación y ejecución del programa que dependen del ordenador que se utilice. MINUIT es una facilidad instalada en numerosos ordenadores y fácilmente transportable o adaptable. Puede observarse que las subrutinas desarrolladas lo están en un lenguaje - FORTRAN de alto nivel, lo que hace que también sean fácilmente adaptables a cualquier instalación de calculadora suficientemente potente.

(1) Ya que si en la expresión III.3.5 sustituimos B por B + M tenemos la siguiente expresión:

$$E = \frac{B + M}{F} \left( 1 - \left( 1 - \frac{1}{B + M} \right)^F \right)$$

que habrá de ser modificada para considerar que sólo la fracción B del conjunto B+M al que se adhieren los fagos puede ser infectado. Luego la eficacia (Ef') sería:

$$Ef' = \frac{B}{B + M} \times E$$

que es la expresión III.3.6.

(2) En una primera aproximación se considera como número de membranas producido ( $\Delta N_M$ ) en cada intervalo  $\Delta t$  igual al de bacterias que explotan en dicho intervalo:  $\Delta' N_B(t)$ . El número de membranas para cualquier intervalo  $\Delta t$  ( $N_M(t)$ ) se calcula como el número de membranas presentes en el intervalo anterior ( $N_M(t-1)$ ) más las producidas en ese intervalo.



FIGURA III.1 Esquema ilustrativo correspondiente a las parametrizaciones de la curva de crecimiento bacteriano (III.2.1). Se muestra una línea continua que representa una hipotética evolución del logaritmo neperiano del número de bacterias en función del tiempo. Las líneas discontinuas marcan la separación entre la fase de latencia-exponencial y exponencial-preestacionaria.

FIGURA III.2 Esquema ilustrativo del texto (III.4), en el que se presentan las expresiones utilizadas en los cálculos que realiza el modelo numérico de lisis. Dicho esquema es muy simple y sólo se incluye en él lo que sería una figurada evolución - del número de bacterias en función del tiempo (línea continua) en un cultivo infectado a un tiempo  $t.I.$ , correspondiente a un momento de infección  $MnI$ . Se muestran dos intervalos  $\Delta t$  correspondientes a cualquier tiempo  $t$  para el que se realizan los cálculos y a un tiempo de generación del fago ( $t_E$ ) anterior.

$a = \frac{v}{2t_0} = \text{pendiente 1}^{\text{a}} \text{ zona}$

$a_0 = \text{pendiente 2}^{\text{a}} \text{ zona}$

$c = \text{pendiente 3}^{\text{a}} \text{ zona}$

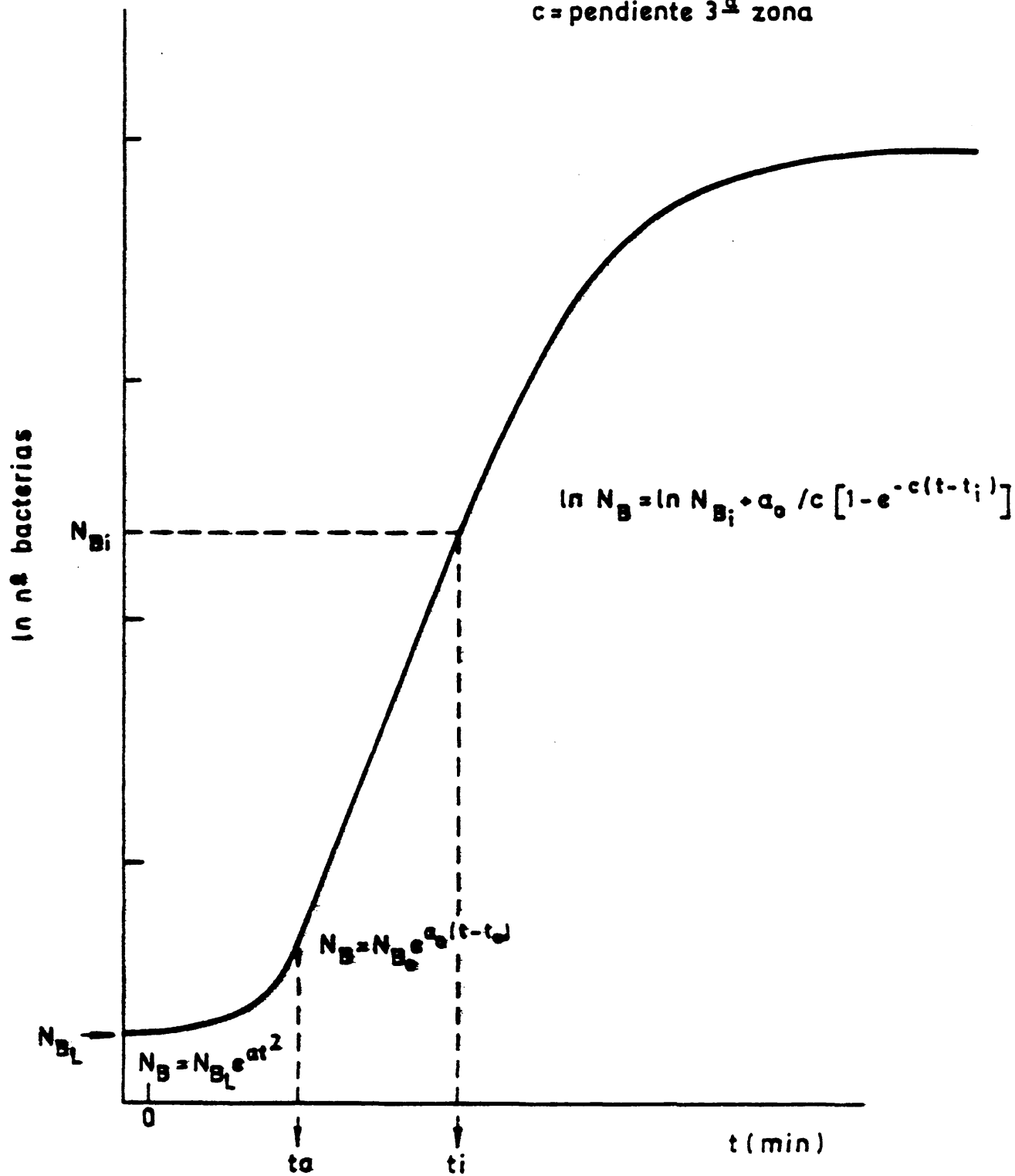


FIG. III-f

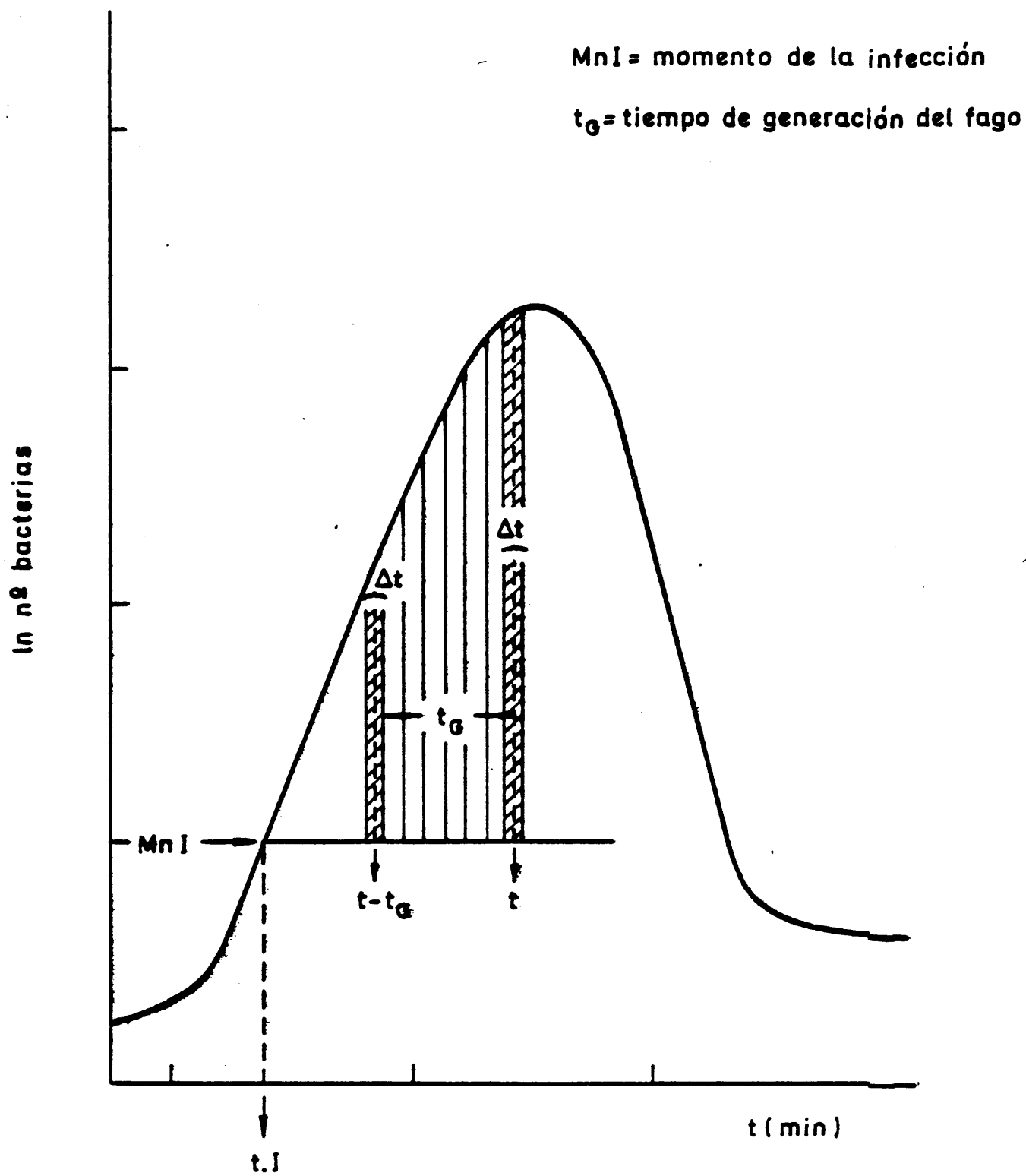


FIG. III-2

#### IV.1 Introducción

Como vimos en el capítulo anterior, la interpretación del proceso de lisis a partir del modelo numérico propuesto supone la consideración de ciertas hipótesis en las que se sustentan los cálculos de la evolución del número de bacterias en los cultivos, tanto en ausencia como en presencia de fagos. En este capítulo presentamos los métodos utilizados para la comprobación de las hipótesis que llamabamos mayores, es decir aquellas cuya consideración es más fundamental en la interpretación del proceso.

Como ya ha sido referido, la hipótesis de partida del modelo numérico es la parametrización utilizada para describir el crecimiento bacteriano en ausencia de fagos, y consecuentemente será la primera a la que haremos referencia, para en secciones posteriores continuar con las hipótesis utilizadas para considerar la aproximación de fagos a bacterias y la eficacia de la infección.

#### IV.2 Comprobación de la parametrización propuesta para la curva de crecimiento bacteriano

Anteriormente presentamos una descripción de la evolución de los cultivos bacterianos en ausencia de fagos (III.2.1) e introducimos las parametrizaciones a través de las cuales pretendemos describir las distintas zonas de la curva de crecimiento bacteriano. En esta sección expondremos el procedimiento seguido para relacionar las medidas de densidades ópticas en función del tiempo, que han sido habitualmente realizadas en el seguimiento de la evolución de los cultivos, con los números de bacterias por mililitro. Es decir, pretendemos definir la función que relaciona el número de bacterias con la densidad óptica, así como la indeterminación en dicho número a partir de los errores que afectan al propio contaje de bacterias y a la densidad óptica.

## Transformación densidad óptica número de bacterias.

La hipótesis de partida en la determinación de la relación número de bacterias-densidad óptica es la existencia de una aplicación biunívoca entre ambas variables. Dicha hipótesis, generalmente aceptada, está supuesta en el enunciado de la ley de Beer que establece, para valores pequeños de la densidad óptica, que dicha relación es lineal. En nuestro caso, utilizaremos una aproximación que nos permita obtener el parámetro lineal incluido en la ley de Beer y a la vez nos proporcione información sobre la bondad de esa descripción. En concreto, hemos supuesto una expresión de la forma

$$N_B = f(DO) \quad (IV.2.1)$$

en donde  $f$  representa la función lineal.

Para poder determinar los parámetros que definen la función  $f$ , que son evidentemente la ordenada en el origen y la pendiente de la recta, hemos utilizado un método estadístico de estimación, el método de mínimos cuadrados. Concretamente la función minimizada ha sido la siguiente:

$$N_{Bi} = a + bDO_i \quad (IV.2.2)$$

donde  $a$  y  $b$  son los parámetros a determinar y  $N_i$  y  $DO_i$  son respectivamente el número de bacterias y la densidad óptica correspondientes al punto  $i$  de los determinados experimentalmente. Consecuentemente, son dos las variables que es preciso calcular, número de bacterias y densidad óptica, junto con sus indeterminaciones experimentales, para establecer analíticamente su correlación. En principio la medida de ambas no presenta dificultad especial, ya que el número de bacterias se obtiene a través del conteo realizado tras plaqueo de la muestra experimental correspondiente y la densidad óptica se obtiene por observación directa en el espectrofotómetro. Sin embargo, la determinación de las incertidumbres estadísticas en ambas variables es de mayor complejidad. En concreto, para obtener  $\Delta N_i$  ha sido necesario realizar varios contajes de bacterias en muestras correspondientes

al mismo valor de densidad óptica y determinar la varianza de los valores obtenidos. El número de bacterias representativo de dicho punto de densidad óptica es el valor medio de los calculados en los diferentes contajes.

La determinación del error en los valores de la densidad óptica presenta alguna dificultad adicional. En principio y sólo para los valores utilizados en la tabla de datos referida, hemos considerado el error estadístico en el valor medio, obtenido en forma similar al correspondiente al número de bacterias a partir de las medidas de densidad óptica en cuatro cultivos diferentes procedentes todos de un cultivo de noche y en los que se ha procurado que el crecimiento tuviera lugar en idénticas condiciones experimentales. Sin embargo, y con objeto de no tener que realizar la misma operación en todos los valores de densidad óptica obtenidos en los diferentes procesos de crecimiento y lisis de bacterias que serán presentados más adelante, hemos determinado una función que nos relaciona la incertidumbre en la densidad óptica como función de la densidad óptica misma a partir de los valores que integran la tabla indicada. En principio la razón para considerar la función  $DO = f(DO)$  (IV.2.3) es simplemente empírica ya que está presente en los datos experimentales. Efectivamente la figura (IV.1) muestra la evolución de las incertidumbres en la densidad óptica como función de la densidad óptica y la correlación entre ambas puede observarse claramente. La línea continua que sigue los datos experimentales corresponde a la proyección de un ajuste utilizando un método  $x^2$  en donde la parametrización utilizada ha sido igualmente polinómica y también la aproximación lineal ha resultado suficiente. La tabla (IV.1) muestra los datos así como los resultados numéricos del ajuste que han sido empleados, como posteriormente mostraremos, en la determinación del error en el número de bacterias en cualquier punto de un cultivo seguido mediante determinación de densidades ópticas.

La tabla (IV.2) muestra el conjunto de valores experimentales utilizados en obtener la aplicación  $NB = f(DO)$ . Los resultados del ajuste en la determinación de la correlación para densidades ópticas inferiores a 0.65 unidades ópticas por mililitro proporcionan un valor para el parámetro correspondiente al ajuste lineal de  $2.4 \pm 0.2 \times 10^8$  y la figura (IV.2) muestra la proyección del mejor ajuste correspondiente a dicha aproximación lineal. En los experimentos realizados nos restringiremos a la zona en la

que esta aproximación lineal es válida. Para ello realizaremos diluciones del cultivo de tal forma que la densidad óptica medida se encuentre en la región de validez de la aproximación, multiplicando posteriormente el número de bacterias obtenido por el factor de dilución correspondiente.

#### IV.2.2 Evolución del cultivo bacteriano

La evolución de un cultivo bacteriano y consecuentemente la relación del logaritmo neperiano del número de bacterias con el tiempo, presenta como sabemos tres fases diferentes que fueron descritas en (III.2.1) y cuya parametrización también fué expuesta.

Como se recordará, la parametrización propuesta para las distintas zonas de la curva de crecimiento bacteriano era la siguiente:

1\* Zona - fase de latencia

$$N_B = N_{B_L} e^{at^2} \quad (\text{IV.2.4})$$

2\* Zona - fase de crecimiento exponencial

$$N_B = N_{B_0} e^{a_0(t-t_0)} \quad (\text{IV.2.5})$$

3\* Zona - fase preestacionaria-estacionaria

$$\ln N_B = \ln N_{B_i} - a_0/c \left[ 1 - e^{-c(t-t_i)} \right] \quad (\text{IV.2.6})$$

El significado de estas expresiones es el descrito en (III.2.1). En la realización experimental de los crecimientos de bacterias los puntos que aparecen en los diagramas  $\ln(N_B) \rightarrow t$  han sido determinados de la forma siguiente:

- Los valores que representan el número de bacterias para cada instante se han obtenido a partir de las densidades ópticas medidas en el espectrofotómetro y aplicando la transformación que corresponde a la expresión -

(IV.2.2) con la estimación paramétrica anteriormente presentada.

- El error en el número de bacterias ha sido evaluado a partir de la expresión:

$$\Delta N_{Bi} = \left[ \left| \frac{\partial f(DO)}{\partial (DO)} \right|_{DO_i} \Delta DO_i \right]^2 + \left[ \left| \frac{\partial f(DO)}{\partial \alpha} \right|_{DO_i} \Delta \alpha \right]^2 \quad (IV.2.7)$$

en donde  $\left| \frac{\partial f(DO)}{\partial (DO)} \right|_{DO_i}$  y  $\left| \frac{\partial f(DO)}{\partial \alpha} \right|_{DO_i}$  representan las derivadas

parciales de la función  $f$  respecto a cada densidad óptica y el parámetro (pendiente de la expresión lineal) respectivamente,  $\Delta DO_i$  es el error en la densidad óptica y  $\Delta \alpha$  el error en el parámetro  $\alpha$ .  $\Delta DO$  ha sido determinado a partir del valor de la densidad óptica en la forma ya explicada y  $\Delta \alpha$  es el error en el parámetro obtenido mediante el ajuste que nos proporciona la función  $N_B = f(DO)$  y que también ha sido descrito.

La transformación de  $\Delta N_{Bi}$  en  $\Delta (\ln(N_{Bi}))$  la hemos realizado mediante la expresión siguiente:

$$\Delta (\ln(N_{Bi})) = \frac{1}{N_{Bi}} \Delta N_{Bi} \quad (IV.2.8)$$

Es ahora conveniente referirnos a la estabilidad de las condiciones experimentales empleadas en el crecimiento de los cultivos bacterianos. - Precisamente con objeto de estudiar dicha estabilidad hemos seguido la evolución de la densidad óptica en función del tiempo en cuatro cultivos inoculados a la vez, en las condiciones experimentales descritas en (II.3).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura (IV.3), donde se observa claramente la evolución paralela de los valores de densidad óptica en función del tiempo para los cuatro cultivos y en especial para la pendiente correspondiente a la fase de crecimiento exponencial. Lo cual nos permite aplicar la transformación obtenida del ajuste de densidades ópti-



cas en función del número de bacterias a lo largo de toda la curva de crecimiento, para todos los cultivos estudiados.

Para cada uno de los crecimientos realizados hemos ajustado la expresión descrita y estimado, mediante el estimador  $\chi^2$ , los mejores valores de los parámetros que definen la evolución del crecimiento. Los ajustes han sido realizados simultáneamente a los datos correspondientes a los cultivos referidos con anterioridad y el nivel de confianza obtenido en la descripción ha sido razonable  $\chi^2/ND = 29/79$ . Los valores de los parámetros obtenidos son:

$$a = 0.00021 \pm 0.00004$$

$$a_0 = 0.0196 \pm 0.0005$$

$$c = 0.0098 \pm 0.0004$$

$$t_i = 130 \pm 24$$

y de ellos pueden derivarse los valores del tiempo ( $t_0$ ) que delimita la separación entre las dos primeras zonas de la curva de crecimiento, el tiempo de duplicación bacteriano ( $t_d$ ) y las indeterminaciones correspondientes originadas por los errores estadísticos inherentes a los datos experimentales. Los resultados son

$$t_0 = \frac{a_0}{2a} = 46 \pm 10 \text{ min.}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{a_0} = 35 \pm 2 \text{ min.}$$

Como puede observarse, la zona de crecimiento estrictamente lineal es 84 - min.

Como se observa en la figura (IV.4) la descripción obtenida como resultado de los ajustes es adecuada y depende de un número mínimo de parámetros (4) a pesar de ser una evolución compleja.

Como hemos descrito en el capítulo anterior (III.3) se ha supuesto que el fenómeno de la aproximación del fago a la bacteria tiene lugar como un proceso de índole estadístico, es decir como consecuencia de los choques al azar entre los fagos y las bacterias presentes en el cultivo. La hipótesis parece razonable en una primera aproximación, aunque la adsorción del fago a la bacteria responda, después del choque, a factores más específicos como la presencia de un receptor proteico en la membrana de la bacteria (ver I.3).

La expresión para interpretar la adsorción en un proceso de tipo estadístico es la siguiente:

$$N_F = N_{F_0} e^{-KN_B t} \quad \text{IV.3.1}$$

de acuerdo con la cual el número de fagos libres en el medio ( $N_F$ ) es función, en cada momento, del número de fagos inicial ( $N_{F_0}$ ), del número de bacterias ( $N_B$ ), del instante ( $t$ ) que se considere y de una constante  $K$  dependiente del fago y bacteria utilizados así como de las condiciones experimentales.

En esta sección mostramos la experimentación realizada con objeto de comprobar la validez de la expresión IV.3.1 así como determinar el valor de la constante  $K$  para condiciones experimentales de los cultivos utilizados.

La metodología empleada para obtener las conclusiones en las que estamos interesados ha sido la siguiente:

- 1- Se han realizado infecciones de cultivos bacterianos crecidos en las condiciones experimentales habituales, para distintas situaciones iniciales de concentración bacteriana y de multiplicidad. Una relación de las mismas aparece en la tabla IV.3.
- 2- La experimentación ha consistido en todos los casos, en la determinación del número de placas de lisis para muestras tomadas en distintos tiempos. La metodología empleada se describió en detalle en II.3.
- 3- Para los cultivos referidos se ha determinado el tiempo límite a partir del cual era posible apreciar un aumento notable en el número de placas de lisis, correspondiente a los fagos procedentes de las explosiones

se, como es fácil suponer, con el tiempo de generación del fago. El resultado muestra una brusca subida en el número de fagos posterior a los 45 minutos después de la infección.

4 - Con los cultivos descritos y el intervalo de tiempo comprendido entre el momento de la infección y el tiempo límite determinado, se han tomado muestras a intervalos de aproximadamente 5 minutos que, convenientemente diluidas, han servido para determinar el número de placas de lisis. Para cada tiempo se han sembrado las muestras de la dilución adecuada sobre 3 placas. Las determinaciones referidas se han realizado para:

a) Muestras filtradas

b) Muestras directas no filtradas

Las placas de lisis determinadas en las muestras (a) hemos supuesto que correspondían a los fagos libres presentes en el medio, ya que aquellos adheridos a bacterias no atravesarían el filtro. Los valores obtenidos se muestran en las figuras IV.5 a IV.14 representados por puntos negros.

Las placas de lisis obtenidas a partir de las muestras (b) deberían corresponder a fagos libres mas bacterias infectadas. Su evolución temporal se muestra en las figuras IV.5 a IV.14 simbolizadas por puntos blancos. Puede observarse como los valores se mantienen constantes (teniendo en cuenta el error experimental). Es interesante indicar que este comportamiento es anormal, ya que solo podría interpretarse si a cada bacteria se aproximara un único fago.

La diferencia entre los números calculados con ambas muestras estimamos que nos proporcionaría el número de bacterias infectadas.

Hechas las determinaciones experimentales descritas hemos realizado ajustes, para cada situación inicial (ajustes tipo I), de los datos correspondientes a la evolución de los fagos libres con el tiempo, utilizando la expresión IV.3.1. El método estadístico de estimación ha sido el mismo que para ajustes precedentes, es decir, el de mínimos cuadrados. Los resultados aparecen en las 3 primeras columnas de la tabla IV.4 en las que se muestra: el número de referencia de las condiciones del cultivo (tabla IV.3), el parámetro K resultado del ajuste, y la relación  $\chi^2/ND$ , siendo ND, como es usual, el número de grados de libertad. La interpretación de los datos experimentales obtenida con la estimación aparece en las figuras IV.5 a IV.14 (líneas discontinuas). Pueden observarse los siguientes efectos:

ajustes, satisfactoria. En general el valor de  $\chi^2/ND$  es menor o aproximadamente igual a la unidad salvo para los cultivos números 4, 10 y 13 en que el resultado puede ser consecuencia de una fluctuación estadística.

2 - Los valores del parámetro K presentan significativas diferencias entre uno y otro ajuste. Como las curvas están numeradas de menor a mayor número de bacterias y dentro de ellas de mayor a menor multiplicidad de infección, es posible reconocer que el valor del parámetro K decrece significativamente a medida que aumenta el número de bacterias presentes en el cultivo, lo que es incompatible con la hipótesis de que K es una constante solo dependiente del fago y bacteria utilizados y de las condiciones experimentales.

3 - Para aquellos cultivos con el mismo número inicial de bacterias hay diferencias apreciables, en alguno de los casos, entre los valores de K obtenidos. (cultivos 6, 7 y 8).

Como consecuencia de los efectos expuestos se realizan nuevos ajustes, por grupos de igual número de bacterias (ajustes tipo II) cuyos resultados aparecen en las dos siguientes columnas de la tabla IV.4. Como era de esperar algunos de los valores de  $\chi^2/ND$  para grupos con igual número de bacterias, utilizados simultáneamente en la estimación, son anormalmente altos. De nuevo la evolución del valor de K con el número de bacterias muestra un comportamiento significativamente diferente cuando este aumenta.

Cuando se hace un ajuste simultáneo (ajuste tipo III) a todos los datos experimentales se obtiene un valor desmesuradamente alto de la relación  $\chi^2/ND$  (ver tabla IV.4), y el valor de K obtenido es de  $(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-10}$ . Es necesario hacer notar que la validez en la determinación del error en K está limitada por el valor anormalmente alto del  $\chi^2$ . La interpretación de los datos obtenida con la estimación se muestra en las figuras IV.15 a IV.24.

Puesto que la evolución del logaritmo de K con el logaritmo del número de bacterias se muestra aproximadamente lineal (fig. IV.25), la dependencia de K con  $N_B$  ha sido estimada mediante ajuste a la expresión

$$K = K_0 N_B^a$$

IV.3.2

-  $0.95 \pm 0.03$  y una relación  $x^2/ND$  insatisfactoria (60/17). La proyección de la mejor estimación obtenida aparece junto con los valores de  $K$ , para cada número de bacterias, en la figura IV.25. Sustituyendo la expresión IV.3.2 en IV.3.1 se llega al sorprendente resultado de que el número de fagos libres presentes en el medio y en concreto su evolución con el tiempo es independiente del número de bacterias, en contradicción con lo que puede esperarse para un choque estadístico, ya que implica que la densidad bacteriana no afecta a la rapidez de la aproximación fago bacteriana.

Una posible explicación al efecto observado, cuya validez es necesario comprobar, está en el hecho de que el número de bacterias ( $N_B$ ) utilizado para los ajustes con la expresión IV.3.1 ha sido constante e igual al número de bacterias iniciales, sin considerar el crecimiento bacteriano de aquellas no infectadas. En consecuencia hemos procedido a realizar los mismos tipos de ajustes I, II y III teniendo en cuenta, numéricamente y de acuerdo con la curva de crecimiento, dicha variación en el número de bacterias. Los resultados se muestran en la tabla IV.5; puede observarse que son muy similares a los anteriores (tabla IV.4), y por lo tanto no es esta la explicación del efecto detectado. El ajuste a la expresión IV.3.2 de estos nuevos valores de  $K$ , proporciona un valor para el parámetro  $a$  ( $-0.96 \pm 0.03$ ) que puede considerarse igual al obtenido anteriormente ( $-0.95 \pm 0.03$ ).

Una vez comprobado que el resultado no era debido a la aproximación utilizada en IV.3.1 nos pareció razonable revisar el proceso seguido en la experimentación, esperando encontrar la existencia de algún factor imprevisto que pudiera influir en ella, deformando los resultados. Pensando en las distintas fases de la experimentación consideramos que quizá la agitación a la que se sometían las muestras iniciales al hacer las diluciones era posible causa, por su violencia, del desprendimiento de fagos adsorbidos en la primera etapa de la adsorción, es decir, cuando es reversible (ver I.4).

Esta hipótesis posible podría interpretar la evolución con el tiempo del número de bacterias infectadas y fagos libres que aparece en las figuras IV.5 a IV. 14 y que presenta un comportamiento constante, independientemente de cual sea el número de bacterias y de fagos inicial. La razón sería que posiblemente se están contando también los fagos no eficaces, por haberse desprendido de las bacterias, pero sin perder por ello su capacidad para infectar nuevamente.

correspondientes a distintas relaciones iniciales fago bacteria puesto que, para aquellos casos en que el número inicial de fagos es pequeño comparado con el de bacterias, la eficacia de infección deducida proporciona valores muy cercanos a 1. Consecuentemente no puede haber desprendimiento por no existir fagos adheridos que no provocan la infección. Sin embargo para aquellos grupos de datos en que la relación fago bacteria es grande existen varios fagos adheridos por bacteria cuyo posible desprendimiento distorsionaría el significado que pretendía darse a las medidas. La relación de grupos de datos establecida, así como el resultado del parámetro  $a$ , obtenido tras los ajustes de los mismos a la expresión IV.3.2, aparece en la tabla IV.6 y en la figura IV.26. Puede observarse que el parámetro  $a$  varía progresivamente entre -0.66 y 1 lo que soporta la interpretación referida, ya que es para altos valores de la relación fago bacteria que no existe dependencia de la evolución temporal del número de fagos libres con la densidad bacteriana. Puede observarse además, que el valor de  $X^2/ND$  en los distintos ajustes a los grupos de datos de la tabla IV.6 también empeora progresivamente cuando aumenta la multiplicidad, lo que implica una mayor incoherencia entre ellos.

La descripción empírica de la aproximación fago-bacteria que necesitamos introducir en nuestro modelo interpretativo del proceso de lisis no es, sin embargo, la de la expresión IV.3.1, si damos como válidos los resultados que se obtienen para los datos correspondientes a valores bajos de la relación fago-bacteria. La expresión apropiada sería la siguiente:

$$N_F = N_{F_0} e^{-KN_B^{1/3} t} \quad \text{IV.3.3}$$

ya que es la que aproximadamente se obtiene al sustituir IV.3.2 en IV.3.1 introduciendo el valor del parámetro  $a$  calculado con los grupos de datos de baja multiplicidad (menor que 1/300).

Con objeto de determinar el valor del parámetro  $K$  que describe la aproximación en el cuadro de la expresión IV.3.3. hemos realizado ajustes del tipo I y III. Es decir individuales y simultáneos a los datos sobre dependencia temporal del número de fagos libres que aparecen en la tabla IV.3 numerados como 5, 8, 10, 12, 14, 16 y 17 y correspondientes a multiplicidades de infección inferiores a 1/300. El resultado es el que apa-

- 1.- Los valores de la relación  $\chi^2/ND$  para cada uno de los ajustes individuales son próximos a 1 lo que indica que la interpretación de los datos es razonable.
- 2.- Las estimaciones obtenidas para el parámetro K son compatibles entre si, como demuestra la figura IV.27 en donde, además, puede observarse que no existe dependencia alguna entre los valores de K y la densidad bacteriana de los datos a que corresponden.
- 3.- La relación  $\chi^2/ND$  para el ajuste simultáneo es compatible con la unidad lo que implica una buena descripción de todos los datos en conjunto.
- 4.- El valor del parámetro K obtenido en el último ajuste (tipo III) es de  $(6.4 \pm 0.4) \times 10^{-5}$

Sobre las figuras IV.5 a IV.14 se muestran, para las que corresponden a multiplicidades de infección inferiores a 1/300, las proyecciones correspondientes a las mejores estimaciones obtenidas en los ajuste individuales (líneas continuas). Las figuras IV.15 a IV.24 muestran la proyección correspondiente a la mejor estimación en el ajuste simultáneo (líneas continuas) para multiplicidades de infección inferiores a 1/300. Una forma alternativa de determinar el parámetro K sin que las medidas sean afectadas por el desprendimiento de fagos es la de realizar el mismo tipo de experimentación pero sin agitar bruscamente en la preparación de las diluciones. Naturalmente ello implica una distribución menos uniforme de los fagos en el medio y consecuentemente una mayor fluctuación entre los valores obtenidos para el número de fagos por conteo de placas de lisis. Los valores obtenidos para el número de fagos libres y el de fagos libres y bacterias infectadas correspondientes a las muestras filtradas y sin filtrar, respectivamente, aparecen en las figuras IV.29 y IV.28, en las que puede apreciarse un error mayor en cada uno de los puntos experimentales, a pesar de que en su determinación se utilizaron los valores obtenidos por siembra de seis placas en vez de tres. La observación de dichos datos permite verificar que la evolución de los valores correspondientes a fagos libres más bacterias infectadas no es constante con el tiempo, lo que implica que efectivamente existía un desprendimiento de fagos debido a la agitación y que una parte de los que se adhieren no son eficaces (en el sentido de que no inyectan su DNA ni pierden su capacidad de infección). Esto último puede afirmarse porque las relaciones fago bacteria utilizadas en las medidas ha sido alta en todos los casos. Puede incluso apreciarse que la disminu-

más rápida cuanto mayor es la relación fago-bacteria, o lo que es lo mismo, el número de fagos adheridos no eficaces aumenta más rápidamente con el tiempo cuanto mayor es la relación fago bacteria inicial.

Las evoluciones del número de fagos libres con el tiempo, determinadas sin agitación han sido ajustadas individual y simultaneamente (ajustes tipo I y III) utilizando la expresión IV.3.3 con objeto de obtener nuevos valores del parámetro K. Los resultados que aparecen en las figuras IV.29 y IV.30, muestran una buena descripción de los datos experimentales (relaciones  $x^2/ND$  próximas a 1), compatibilidad entre los valores de K obtenidos, una descripción simultánea razonable (Fig. IV.30) y un valor del parámetro K, para este último ajuste que es perfectamente compatible con la estimación precedente ( $(6 \pm 1) \times 10^{-5}$  a comparar con  $(6.4 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ ). Su valor promedio proporciona un valor final del parámetro K, de  $(6.3 \pm 0.4) \times 10^{-5}$

Es de gran importancia poner de manifiesto que la expresión IV.3.3 es permanentemente empírica y válida para describir aproximadamente el proceso de adherencia de los fagos a las bacterias en muestras condiciones experimentales. El hecho de que aparezca  $1/3$  como potencia del número de bacterias en IV.3.3, no es lo esperado para un choque estadístico fago-bacteria a menos que otros procesos tengan lugar. Hemos pensado que es probable que los choques entre bacterias provoquen el desprendimiento de los fagos adheridos a cualquiera de ellas. La probabilidad de dicho choque depende, evidentemente, de la densidad bacteriana. No obstante una parametrización concreta que tenga en cuenta este efecto y que incluya además la posible adherencia múltiple de fagos a cada bacteria, es extraordinariamente compleja. Consecuentemente hemos optado por aceptar la parametrización empírica que, como posteriormente veremos, ha sido útil y apropiada para la descripción de los procesos de lisis.



#### IV.4 Comprobación experimental de la expresión deducida para la eficacia de infección

Uno de los componentes fundamentales del modelo propuesto, es la expresión deducida en (III.3.1) para la eficacia de infección que hemos definido como la relación entre el número de fagos eficaces y el total de fagos aproximados a bacterias.

La expresión (III.3.5) nos indica que en aquellas zonas de las curvas de lisis en las que el orden del número de bacterias es superior al del número de fagos los valores de la eficacia son próximos a la unidad y, en consecuencia, su consideración no implica variaciones sustanciales en las predicciones del modelo. Sin embargo, en aquellas otras zonas en las que el número de fagos es del mismo orden o superior al de bacterias, la expresión referida proporciona valores muy diferentes de 1, lo que indica que ~~por cada bacteria infectada el número de fagos aproximados es muy grande~~ lo que tiene implicaciones decisivas en las predicciones del modelo. Por lo tanto, es de gran interés comprobar experimentalmente la validez de la expresión deducida para la eficacia. Con este objeto se han realizado las dos siguientes experimentaciones parciales.

1.- Hemos utilizado los datos obtenidos para la comprobación de la expresión representativa de la aproximación de fagos a bacterias. Es decir, las determinaciones realizadas de la evolución del número de placas de lisis en función del tiempo de muestras de cultivos bacterianos infectados, antes y después de la filtración, según se describió en (IV.3).

En un principio, y antes de concluir que los fagos no eficaces podían desprenderse de las paredes bacterianas e infectar otras bacterias, pensamos que los valores obtenidos para las muestras no filtradas y filtradas correspondían, respectivamente, al número de fagos libres más bacterias infectadas y al de fagos libres. En consecuencia, era inmediato por sustracción conocer el número de bacterias infectadas y de ahí la eficacia de la infección. Sin embargo, el desprendimiento de los fagos no eficaces varió el significado de los valores obtenidos y fué necesario reinterpretarlos paramétricamente como posteriormente expondremos. El resultado obte

nido para la eficacia con estos datos proporcionaba altos errores estadísticos en su determinación y el método se consideró inadecuado ante la imposibilidad práctica de aumentar la precisión en los valores experimentales medidos.

2.- Un segundo método alternativo podría ser el de estudiar la variación del número de bacterias en función del tiempo durante el tiempo transcurrido desde el momento de la infección y la explosión de las primeras bacterias infectadas.

En ausencia de fagos, las curvas de crecimiento bacteriano siguen la evolución propuesta por las expresiones (IV.2.4 a IV.2.6), que se ve modificada al introducir fagos debido a que las bacterias que van siendo infectadas no siguen el proceso de duplicación. Puesto que las precisiones con las que se determinan los números de bacterias por medidas de densidad óptica son bastante mayores que las obtenidas en los contajes de fagos, estimamos que podría ser posible determinar eficacias en base a las desviaciones de la evolución del cultivo en presencia de fagos respecto de la curva de crecimiento bacteriano. En consecuencia, estudiamos primeramente las desviaciones referidas para después determinar la región de valores de eficacia que podría ser comprobada de acuerdo con la precisión en las determinaciones del número de bacterias. A continuación hemos determinado, por ajuste a los comienzos de distintas curvas de lisis, las eficacias correspondientes que se han comparado con las predicciones de la expresión -- (III.3.5).

Seguidamente expondremos, con mayor detalle, los métodos y parametrizaciones utilizados en ambas alternativas, así como los resultados obtenidos.

### Método 1

Puesto que en la experimentación realizada para determinar la expresión representativa de la aproximación los fagos considerados ineficaces se desprenden de las bacterias, la variación del número de fagos "libres" en función del tiempo determinada experimentalmente corresponderá en realidad a la variación del número real de fagos libres más la de los fagos ine

ficaces. Por tanto, la variación determinada experimentalmente ( $N_{Fexp}$ ) podría expresarse a través de la siguiente expresión

$$N_{Fexp} = N_{Fo} e^{-KN_B^{1/3} t} + K N_B^{1/3} N_{Fo} \int_0^t (1-Ef) e^{-K N_B^{1/3} t} dt \quad (IV.4.1)$$

en la que el primer sumando representaría la variación de los fagos libres en función del tiempo según la expresión (IV.3.3), y el segundo la de los fagos ineficaces, que representa la integral de la expresión:

$$d N_{Fi} = -K N_B^{1/3} N_F (1-Ef) dt \quad (IV.4.2)$$

en donde  $d N_{Fi}$  es la componente debida a los fagos ineficaces del total de los absorbidos en el intervalo  $dt$  considerado.

A partir de la expresión (IV.4.1), y haciendo la hipótesis de que durante el tiempo en que se realizan las medidas (aproximadamente 40 min), - la eficacia no es función del tiempo, tendríamos, resolviendo la integral, la siguiente expresión:

$$N_{Fexp} = N_{Fo} \left[ (1-Ef) + Ef e^{-K N_B^{1/3} t} \right] \quad (IV.4.3)$$

El ajuste a la expresión (IV.4.3) de los resultados experimentales permite obtener paramétricamente las eficacias. Los resultados de dicho ajuste no permiten hacer una comprobación de la parametrización propuesta porque los

errores con los que se determinan las eficacias son muy grandes, del orden del 50% al 100%. Estos resultados parecen indicar que la sensibilidad del método experimental no es suficiente para la determinación requerida<sup>(1)</sup>.

## Método 2

### Determinación de las eficacias a partir de densidades ópticas

Este nuevo intento para la comprobación de la validez de la expresión (III.3.5), utilizada en el modelo descrito para el cálculo de la eficacia, se fundamenta, como ya se ha referido, en el hecho de que cuando a un cultivo bacteriano se le añade un cierto número de fagos, las bacterias que van siendo infectadas dejan de dividirse. Por tanto, deberá producirse una disminución en las densidades ópticas medidas respecto a las que corresponderían al mismo cultivo en ausencia de fagos. En consecuencia, pretendemos determinar las eficacias, a partir de medidas de densidad óptica en función del tiempo realizadas en cultivos bacterianos infectados a distintas multiplicidades, por comparación con las densidades ópticas correspondientes al crecimiento bacteriano en ausencia de fagos. Para ello, debemos poder relacionar las densidades ópticas medidas en un cultivo infectado con la eficacia correspondiente. Con objeto de establecer dicha relación es necesario conocer la evolución en función del tiempo de los fagos y bacterias presentes en el cultivo. En este sentido, el establecimiento de la relación entre las densidades ópticas medidas y el crecimiento bacteriano en ausencia de fagos no plantea dificultad, ya que como expusimos en (IV.2.2) se ha parametrizado la evolución del crecimiento bacteriano, en las condiciones que se han utilizado en toda la experimentación realizada en este trabajo.

El número de bacterias a cualquier tiempo  $t$  puede determinarse a través de la siguiente expresión:

$$N_B(t) = N_{B(t-1)} + \Delta N_B(t) \quad (\text{IV.4.4})$$

donde  $N_{B(t)}$  y  $N_{B(t-1)}$  son respectivamente el número de bacterias al tiempo  $t$  y  $t-1$ , siendo  $t$  el intervalo considerado y  $t-1$  el inmediatamente anterior (con intervalos  $\Delta t$  de 1 minuto), y  $\Delta N_{B(t)}$  el incremento correspondiente al número de bacterias en el intervalo  $\Delta t$  considerado. Dicho incremento dependerá de la pendiente de la curva de crecimiento ( $a$ ) y del número de bacterias ( $N_{B(t-1)}$ ) en el intervalo  $\Delta t$  anterior de acuerdo con la siguiente expresión (para la fase de crecimiento exponencial):

$$N_{B(t)} = N_{B(t-1)} a \Delta t \quad (IV.4.5)$$

Una vez conocida la relación entre la densidad óptica y el número de bacterias, así como su evolución temporal en cultivos bacterianos en ausencia de fagos, es preciso establecer la relación equivalente pero en cultivos bacterianos en los que se ha introducido un cierto número de fagos. Pues bien, para establecer dicha relación será preciso conocer lo siguiente:

- 1.- Variación del número de fagos en función del tiempo
- 2.- Variación del número de bacterias infectadas en función del tiempo
- 3.- Variación del número de bacterias sin infectar en función del tiempo
- 4.- Variación en el número de bacterias observable por densidad óptica en función del tiempo

1.- La variación del número de fagos en función del tiempo ( $\Delta N_F$ ) es fácilmente calculable a través de la expresión (IV.3.2) representativa del proceso de aproximación conocido, como es el caso, el número de bacterias y fagos iniciales y la constante de la citada expresión.

2.- La variación diferencial del número de bacterias infectadas ( $\Delta N_{Binf}$ ) dependerá de los fagos aproximados en el intervalo de tiempo  $\Delta t$  considerado y de la eficacia de la infección correspondiente ( $E_f$ ), puesto que de los fagos aproximados sólo un cierto porcentaje será eficaz. La expresión que da cuenta del incremento referido es la siguiente:

$$\Delta N_{Binf} = - \Delta N_F \quad \text{E1}$$

(IV.4.6)

de forma que el cálculo del número de bacterias infectadas ( $N_{Binf_t}$ ) a un tiempo  $t$  sólo depende del número de bacterias infectadas en el intervalo anterior ( $N_{Binf_{t-1}}$ ) y del incremento del número de bacterias infectadas ( $\Delta N_{Binf}$ ) correspondiente a dicho intervalo  $\Delta t$  según la siguiente expresión:

$$N_{Binf_t} = N_{Binf_{t-1}} + \Delta N_{Binf} \quad (\text{IV.4.7})$$

3.- La variación del número de bacterias sin infectar corresponderá al crecimiento normal de las bacterias, conocido a través de la parametrización de la curva de crecimiento bacteriano, pero en el cálculo de su número habrá que considerar la disminución que respecto al crecimiento en ausencia de fagos supone la no división de las bacterias ya infectadas. Por lo tanto, el incremento del número de bacterias sin infectar ( $\Delta N_{B_{sinf}}$ ) puede calcularse de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\Delta N_{B_{sinf}} = N_{B_{sinf}} a \Delta t - \Delta N_{Binf} \quad (\text{IV.4.8})$$

siendo  $N_{B_{sinf}}$  el número de bacterias sin infectar en el intervalo  $dt$  considerado, y a la pendiente de la curva de crecimiento bacteriano. Por lo tanto, el número de bacterias sin infectar en cualquier tiempo  $t$  será:

$$N_{B_{sinf}_t} = N_{B_{sinf}_{t-1}} + \Delta N_{B_{sinf}} \quad (\text{IV.4.9})$$

siendo  $N_{B_{sinf}_{t-1}}$  el número de bacterias sin infectar en el intervalo anterior al que se realiza el cálculo.

4.- Dado que nuestro interés reside en poder determinar experimentalmente los valores de la eficacia por medidas de densidad óptica, será preciso co

nocer la variación incremental de dichas densidades ópticas. El incremento en el número de bacterias que corresponde a las densidades ópticas medidas ( $\Delta N_{BDO}$ ) podrá calcularse a partir de la suma de los incrementos correspondientes, al número de bacterias infectadas y sin infectar, a partir de la siguiente expresión:

$$\Delta N_{BDO} = \Delta N_{Binf} + \Delta N_{Bsinf} \quad (IV.4.10)$$

en la que si sustituimos  $\Delta N_{Bsinf}$  por un valor según la expresión (IV.4.8) tendremos:

$$\Delta N_{BDO} = \Delta N_{Binf} + N_{Bsinf} a \Delta t - \Delta N_{Binf} \quad (IV.4.11)$$

de forma que

$$\Delta N_{BDO} = N_{Bsinf} a \Delta t \quad (IV.4.12)$$

El número de bacterias observable por densidad óptica ( $N_{BDO_t}$ ) para un tiempo  $t$  será:

$$N_{BDO_t} = N_{BDO_{t-1}} + \Delta N_{BDO} \quad (IV.4.13)$$

donde  $N_{BDO_{t-1}}$  es el número de bacterias que corresponde a la densidad óptica en el intervalo anterior al tiempo  $t$  considerado.

Una vez establecida, a través de las expresiones anteriores, la relación entre la eficacia y el crecimiento bacteriano en presencia de fagos, nos pareció oportuno, antes de realizar la experimentación correspondiente efectuar un estudio preliminar, especialmente dirigido a evaluar la viabilidad experimental del método propuesto. El procedimiento seguido para ello ha sido el siguiente:

- a) Estimación cualitativa de los valores de la eficacia que podrán ser

comprobados experimentalmente. Puesto que sea o no válida la expresión propuesta para el cálculo de dichas eficacias, es esperable que las diferencias observables por medidas de densidad óptica respecto de la curva de crecimiento en ausencia de fagos sean distintas, según sea el porcentaje de fagos eficaces para una relación fago-bacteria concreta. (De igual forma es esperable que para un mismo porcentaje de fagos eficaces, las diferencias observables sean distintas dependiendo de la multiplicidad de infección). El comportamiento que se observe en situaciones como las expuestas indicará en primera aproximación las zonas de eficacia que podrán ser comprobadas.

b) Estimación cuantitativa de las precisiones requeridas para obtener los valores de las eficacias con la sensibilidad suficiente para probar o no la validez de la expresión desarrollada para su cálculo (III.3.5). Esto es necesario porque podría ocurrir que para obtener los valores de la eficacia con un error aceptable (que permitiera distinguir suficientemente varias eficacias) fuera preciso realizar un número de medidas y con un error no asequible experimentalmente, a pesar de la facilidad de la medida de densidades ópticas.

A continuación exponemos los métodos utilizados para realizar las estimaciones referidas. El primero corresponde a la estimación cualitativa y los siguientes a la cuantitativa.

#### 1.- Generación de curvas teóricas de número de bacterias en función del tiempo.

La generación se realiza paralelamente para la evolución del número de bacterias en ausencia o en presencia de fagos. En el primer caso utilizando los resultados de la parametrización obtenida para las curvas de crecimiento bacteriano y en el segundo las expresiones (IV.4.6) a (IV.4.13) deducidas con este fin<sup>(2)</sup>. Puesto que pretendemos obtener información sobre las zonas de la eficacia que podrán determinarse experimentalmente, la generación teórica se realiza para valores concretos de eficacias: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9. Las situaciones iniciales de número de fagos y bacterias utilizadas se muestran en la tabla (IV.8). Para cada una de ellas se han



realizado 5 generaciones diferentes, correspondientes a los valores de eficacia referidos. Debido al gran número de generaciones que esto supone -- (130) sólo se muestran en la figura (IV.31) algunas de ellas que a nuestro modo de ver son suficientes para dar una idea de las situaciones iniciales que permitirán realizar la comprobación experimental. En la figura (IV.31) se observa que:

a) Al aumentar la multiplicidad aumentan las diferencias entre la curva de crecimiento bacteriano y las correspondientes a situaciones en las que existen fagos

b) Para una misma multiplicidad las diferencias son más apreciables según aumenta la eficacia.

De acuerdo con lo anterior, para multiplicidades de infección menores de aproximadamente  $1/3$  no sería posible determinar las eficacias. Respecto a los valores que podrían ser comprobados, no podemos hacer ninguna afirmación ya que las generaciones anteriores se han realizado para valores de la eficacia fijados arbitrariamente.

2.- Generación de curvas teóricas de número de bacterias en función del tiempo, para distintas situaciones iniciales de número de bacterias, número de fagos y eficacia, que se muestran en las cuatro primeras columnas de la tabla IV.9.

Esta generación es posible utilizando las expresiones (IV.4.6) a (IV.4.13). Dado que se pretende probar la validez de la expresión (III.3.5) los valores a los que se fija la eficacia son los que corresponderían al número de fagos y bacterias considerado en cada caso, según la citada expresión.

Puesto que pretendemos estudiar las precisiones requeridas para determinar la eficacia por medidas de densidad óptica, es preciso transformar los números de bacterias ( $N_{B_i}^T$ ) obtenidos mediante la generación teórica referida en números de bacterias que sean más semejantes a los experimentales, y que denominaremos ( $N_{B_i}^{C \text{ exp}}$ ). Para realizar dicha transformación consideramos los  $N_{B_i}^T$  como el valor central de una distribución gaussiana --

de anchura  $2\Delta N_{B_i}$ , siendo  $\Delta N_{B_i}$  el error en el número de bacterias calculado a partir de la expresión (IV.2.7). A partir de dicho valor central se generan valores al azar, según exponemos a continuación:

- a) Para cada  $N_{B_i}^T$  se genera un número al azar R, entre cero y uno, que se utiliza como vemos en la siguiente expresión

$$N_{B_i}^{c \text{ exp}} = N_{B_i}^T - 2\Delta N_{B_i} + R4 \Delta N_{B_i} \quad (\text{IV.4.14})$$

- b) A partir de  $N_{B_i}^{c \text{ exp}}$ ,  $N_{B_i}$  y  $\Delta N_{B_i}$  se obtiene la gaussiana de valor central  $N_{B_i}^{c \text{ exp}}$

$$\text{Gauss} = e^{-\frac{(N_{B_i}^{c \text{ exp}} - N_{B_i})^2}{2\Delta N_{B_i}^2}} \quad (\text{IV.4.15})$$

- c) Generación de un nuevo número al azar R'. Si el valor obtenido a través de la gaussiana es mayor que R', el valor de  $N_{B_i}^{c \text{ exp}}$  obtenido es aceptado; si, por el contrario, fuera menor, el proceso vuelve a repetirse desde el principio, hasta que sea mayor que R'.

3.- Una vez obtenidos los valores de  $N_{B_i}^{c \text{ exp}}$  y considerando como su error el obtenido a partir de la expresión (IV.2.7), es posible realizar el ajuste de los mismos a las expresiones utilizadas en la generación teórica, pero sin fijar en este caso el valor de la eficacia. Es decir, considerándolo en este caso como parámetro a obtener tras el ajuste. Los resultados correspondientes aparecen en la tabla (IV.9) y en las figuras IV.32 y IV.33 y permiten:

- a) Comparar la eficacia a la que fueron obtenidas las curvas teóricas con la proporcionada por el ajuste. Ambas deben ser compatibles.

- b) Obtener la información requerida sobre la viabilidad experimental del método. Es decir, qué número de medidas de densidad óptica en función del tiempo será necesario realizar para cada situación inicial concreta (multiplicidad de la infección), así como con qué error es preciso determinar los parámetros que relacionan el número de bacterias con la densidad -

óptica a través de la expresión (IV.2.2), ya que es a partir de los mismos como se obtiene el error en el número de bacterias que se considera en todos los casos.

El número de puntos utilizado en los ajustes es 40 y correspondería a realizar las medidas de densidad óptica de minuto en minuto, cuando se efectuara la experimentación. El error en el número de bacterias que correspondería a dichas densidades ópticas se consideró, para cada situación inicial, del 10% ó el 4%. A partir de los resultados que se muestran en la tabla (IV. 9 ) se observa que con un error en la determinación del número de bacterias del 10% podrían comprobarse las siguientes eficacias: 0.1, - 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5. También puede apreciarse que con un error del 4% en el número de bacterias el parámetro requerido puede obtenerse con mayor - precisión; no obstante, conseguir dicho error plantea serios problemas experimentales.

A continuación se muestran las eficacias que, a nuestro modo de ver, sería posible determinar experimentalmente con un error en el número de bacterias del 10% y 40 medidas de densidad óptica, así como la situación inicial a que corresponden.

<u>Relación nº fagos/nº bacterias</u>	<u>Eficacia</u>
7/1	$0.10 \pm 0.02$
4/1	$0.2 \pm 0.04$
3/1	$0.30 \pm 0.06$
2/1	$0.40 \pm 0.10$
1/1	$0.50 \pm 0.15$

Una vez obtenida la información anterior fué necesario, antes de - efectuar las medidas de densidad óptica en función del tiempo para las relaciones fago bacteria referidas, realizar nuevos contajes de bacterias, - puesto que el error que correspondía al número de bacterias, antes de realizar este estudio, era del 14% y que, como hemos visto, para determinar - los valores referidos de las eficacias es necesario un error del 10%. He-

mos de hacer notar que los resultados que aparecen en (IV.2.1) y (IV.2.2) ya han sido modificados teniendo en cuenta los nuevos contajes realizados que permiten obtener a través de la expresión que relaciona el número de bacterias con la densidad óptica el error en el número de bacterias que corresponde a cualquier medida de densidad óptica. Pues bien, una vez disminuida la indeterminación en el número de bacterias, se realizó la experimentación correspondiente que permitió efectuar el ajuste de los datos obtenidos a las expresiones utilizadas en el caso anterior. Los resultados correspondientes aparecen en las figuras (IV.34 a IV.36). En ellos se pone de manifiesto cómo la eficacia determinada experimentalmente es perfectamente compatible con la esperada según el estudio previo realizado. Consecuentemente, la validez de la expresión (III.3.5) queda parcialmente comprobada.

Creemos conveniente indicar que aunque son las eficacias superiores a 0.7 las que no han sido comprobadas experimentalmente, la extrapolación de la validez de la expresión (III.3.5) a las zonas en las que estas eficacias son esperables no supone una aproximación excesiva; ya que corresponden a situaciones experimentales en las que el número de bacterias es considerablemente superior al de fagos. En esta situación, la probabilidad de existencia de fagos ineficaces es mínima, y en consecuencia la interpretación del proceso no se ve prácticamente afectada por la consideración de la eficacia que solo es de gran importancia cuando el número de fagos es del mismo orden o superior al de bacterias.

Pensamos que son, sin embargo, las zonas de muy bajas eficacias (inferiores a 0.05 que corresponden a situaciones en las que el número de fagos es muy superior al de bacterias) las que mayor dificultad de interpretación ofrecen, ya que la validez de la expresión (III.3.5) puede verse restringida para valores tan extremos y suponer discrepancias porcentuales significativas en sus predicciones.

(1) A la vista de los errores obtenidos, sería necesario incrementar sustancialmente el número de medidas para conseguir mayor precisión, lo que no es posible dado que la experimentación realizada ya ocupa la totalidad del tiempo durante el que se realizan las determinaciones.

(2) Los valores de los parámetros que en ellas intervienen, salvo claro está, la eficacia fueron determinados con anterioridad según vimos en secciones precedentes de este capítulo.

- TABLA IV.1 Datos de densidad óptica y errores correspondientes utilizados para el ajuste descrito en el texto. (a) y (b) son los valores de los parámetros obtenidos en dicho ajuste.
- TABLA IV.2 Valores del número de bacterias y densidad óptica utilizados en el ajuste realizado para establecer la relación entre ambos.
- TABLA IV.3 Situaciones experimentales iniciales de número de fagos, bacterias y multiplicidad de infección a que corresponden las determinaciones de fagos libres en función del tiempo descritas en el texto. A cada una de ellas se le asigna un número de curva para su identificación posterior.
- TABLA IV.4 Valores obtenidos para el parámetro K y la relación  $x^2/ND$  - tras los ajustes de tipo I, II y III descritos en el texto - (expresión IV.3.1). El número de curva identifica la situación inicial a que corresponden según la tabla IV.3.
- TABLA IV.5 Valores obtenidos para el parámetro K y la relación  $x^2/ND$  - tras los ajustes tipo I, II y III a la expresión IV.3.1 (con  $N_B$  en función del tiempo). El número de curva indica la situación inicial a que corresponden (tabla IV.3).
- TABLA IV.6 Valores del parámetro  $a$  y la relación  $x^2/ND$  obtenidos tras los ajustes a la expresión IV.3.2, para los grupos de datos correspondientes a las multiplicidades de infección que se especifican.
- TABLA IV.7 Valores obtenidos para el parámetro K y la relación  $x^2/ND$  - tras los ajustes del tipo I y III a la expresión IV.3.3. El número de curva indica la situación inicial a que corresponden según la tabla IV.3.
- TABLA IV.8 Valores iniciales de números de fagos/ml y bacterias/ml, utilizados para realizar la generación de curvas teóricas de número de bacterias en función del tiempo, descrita en el texto.

valores de la eficacia teórica ( $E_{TEO}$ ) y ajustada ( $E_{AJ}$ ) correspondientes a las situaciones iniciales de número de fagos/ml y bacterias/ml que se especifican. Los ajustes de la eficacia se han realizado utilizando errores del 10% y 4% - en el número de bacterias. Las eficacias teóricas son las obtenidas aplicando la expresión (III.3.5). Los valores de  $\chi^2_1$  y  $\chi^2_2$  corresponden respectivamente al ajuste con errores del 10% y 4% en el número de bacterias.

DO	$\Delta DO$
0.090	0.002
0.099	0.004
0.103	0.004
0.117	0.006
0.137	0.006
0.183	0.008
0.203	0.007
0.237	0.009
0.33	0.02
0.35	0.01
0.48	0.02
0.48	0.02
0.63	0.02
0.67	0.03
a    parámetro constante	$(1 \pm 1) \times 10^{-3}$
b    parámetro lineal en DO	$0.037 \pm 0.03$

TABLA IV.1



NB/ml	DO/ml
$1.77 \pm 0.07 \times 10^7$	$0.055 \pm 0.002$
$0.6 \pm 0.1 \times 10^7$	$0.065 \pm 0.002$
$3.2 \pm 0.3 \times 10^7$	$0.095 \pm 0.004$
$2.4 \pm 0.4 \times 10^7$	$0.100 \pm 0.004$
$4.1 \pm 0.9 \times 10^7$	$0.160 \pm 0.006$
$2.9 \pm 0.6 \times 10^7$	$0.175 \pm 0.006$
$3.3 \pm 0.5 \times 10^7$	$0.180 \pm 0.007$
$5.8 \pm 0.6 \times 10^7$	$0.190 \pm 0.007$
$5.1 \pm 0.9 \times 10^7$	$0.220 \pm 0.008$
$6.5 \pm 0.6 \times 10^7$	$0.255 \pm 0.009$
$5.8 \pm 0.9 \times 10^7$	$0.33 \pm 0.01$
$1.1 \pm 0.1 \times 10^8$	$0.34 \pm 0.01$
$7 \pm 1 \times 10^7$	$0.34 \pm 0.01$
$8.6 \pm 0.6 \times 10^7$	$0.39 \pm 0.01$
$1.0 \pm 0.1 \times 10^8$	$0.40 \pm 0.01$
$9.3 \pm 0.9 \times 10^7$	$0.41 \pm 0.01$
$1.3 \pm 0.1 \times 10^8$	$0.49 \pm 0.02$
$1.8 \pm 0.2 \times 10^8$	$0.64 \pm 0.02$

TABLA IV.2

Nº Curva	Nº de bacterias/ml	Nº fagos/ml	Mult. Infección
1	$3.4 \pm 0.3 \times 10^4$	$1.7 \pm 0.1 \times 10^4$	$1/2 \pm 1/0.2$
2	$3.0 \pm 0.2 \times 10^5$	$8.4 \pm 0.7 \times 10^4$	$1/3.6 \pm 1/0.4$
3	$3.6 \pm 0.3 \times 10^6$	$8.4 \pm 0.9 \times 10^4$	$1/43 \pm 1/5.8$
4	$4.6 \pm 0.4 \times 10^7$	$1.1 \pm 0.2 \times 10^7$	$1/4.2 \pm 1/0.8$
5	$4.9 \pm 0.4 \times 10^7$	$1.4 \pm 0.2 \times 10^5$	$1/350 \pm 1/57$
6	$8.6 \pm 0.7 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^7$	$1/6.7 \pm 1/0.7$
7	$8.6 \pm 0.7 \times 10^7$	$5.8 \pm 0.7 \times 10^5$	$1/148 \pm 1/6.6$
8	$8.6 \pm 0.7 \times 10^7$	$9 \pm 2 \times 10^3$	$1/9555 \pm 1/2260$
9	$1.3 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$	$8.5/1 \pm 1/1$
10	$1.5 \pm 0.1 \times 10^8$	$4.9 \pm 0.6 \times 10^3$	$1/30612 \pm 1/4262$
11	$1.7 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.0 \pm 0.2 \times 10^7$	$1/17 \pm 1/3.5$
12	$1.7 \pm 0.1 \times 10^8$	$5.6 \pm 0.8 \times 10^4$	$1/3036 \pm 1/470$
13	$2.1 \pm 0.2 \times 10^8$	$9.1 \pm 0.9 \times 10^6$	$1/23 \pm 1/3.2$
14	$2.3 \pm 0.2 \times 10^8$	$9.2 \pm 0.9 \times 10^2$	$1/250000 \pm 1/32700$
15	$2.6 \pm 0.2 \times 10^8$	$1.6 \pm 0.2 \times 10^7$	$1/16 \pm 1/2.4$
16	$2.6 \pm 0.2 \times 10^8$	$7 \pm 2 \times 10^5$	$1/371 \pm 1/110$
17	$2.6 \pm 0.2 \times 10^8$	$4.7 \pm 0.3 \times 10^4$	$1/5532 \pm 1/553$
18	$3.0 \pm 0.2 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6$	$1/273 \pm 1/31$
19	$4.0 \pm 0.3 \times 10^8$	$5.6 \pm 0.3 \times 10^7$	$1/7 \pm 1/0.7$

TABLA IV.3

TIPO DE AJUSTE Nº CURVA	I		II		III	
	Kx10 <sup>-10</sup>	x <sup>2</sup> /ND	Kx10 <sup>-10</sup>	x <sup>2</sup> /ND	Kx10 <sup>-10</sup>	x <sup>2</sup> /ND
1	6300 <sup>±</sup> 2500	0.4/5	6300 <sup>±</sup> 2500		1.6 <sup>±</sup> 0.1	644/128
2	870 <sup>±</sup> 390	0.3/3	870 <sup>±</sup> 390			
3	60 <sup>±</sup> 27	0.5/4	60 <sup>±</sup> 27			
4	5 <sup>±</sup> 2	7.5/4	7 <sup>±</sup> 1	7/9		
5	7 <sup>±</sup> 2	0.6/4				
6	1.8 <sup>±</sup> 0.5	2.9/7	3.0 <sup>±</sup> 0.3	109/21		
7	4.5 <sup>±</sup> 0.5	2.7/6				
8	2.7 <sup>±</sup> 0.5	2.8/6				
9	1.9 <sup>±</sup> 0.3	3.9/7	1.9 <sup>±</sup> 0.3			
10	1.8 <sup>±</sup> 0.2	15/6	1.8 <sup>±</sup> 0.2			
11	2.2 <sup>±</sup> 0.2	6.9/7	1.9 <sup>±</sup> 0.1	15/14		
12	1.7 <sup>±</sup> 0.2	3.5/6				
13	1.0 <sup>±</sup> 0.2	12/5	1.0 <sup>±</sup> 0.2			
14	1.4 <sup>±</sup> 0.2	2/6	1.4 <sup>±</sup> 0.2			
15	0.6 <sup>±</sup> 0.2	2.5/5	1.1 <sup>±</sup> 0.1	44/21		
16	1.1 <sup>±</sup> 0.2	7.8/7				
17	1.1 <sup>±</sup> 0.2	8/7				
18	0.7 <sup>±</sup> 0.1	8.8/7	1.0 <sup>±</sup> 0.1	35/16		
19	1.0 <sup>±</sup> 0.1	3.7/8				

TABLA IV.4

RESULTADOS DE LOS AJUSTES A LA EXPRESION  $N_F = N_{F_0} e^{-K_{II} B^t}$  (con  $N_B \rightarrow f(t)$ )

TIPO DE AJUSTE Nº CURVA	I		II		III	
	$K \times 10^{-10}$	$x^2/ND$	$K \times 10^{-10}$	$x^2/ND$	$K \times 10^{-10}$	$x^2/ND$
1	$7000 \pm 1800$	0.3/5	$7000 \pm 1800$		$1.3 \pm 0.1$	669/128
2	$950 \pm 300$	0.3/3	$950 \pm 300$			
3	$60 \pm 20$	0.4/4	$60 \pm 20$			
4	$12 \pm 2$	7/4	$7.5 \pm 1.4$	12/9		
5	$6.7 \pm 0.3$	0.5/4				
6	$1.6 \pm 0.3$	2.9/7	$3.3 \pm 0.2$	71/21		
7	$4.6 \pm 0.3$	1.7/6				
8	$3.1 \pm 0.3$	2.3/6				
9	$1.8 \pm 0.2$	3.7/7	$1.8 \pm 0.2$			
10	$1.5 \pm 0.1$	12/6	$1.5 \pm 0.1$			
11	$2.4 \pm 0.1$	6.4/7	$2.1 \pm 0.1$	19/14		
12	$1.8 \pm 0.1$	3/6				
13	$1.5 \pm 0.1$	12/5	$1.5 \pm 0.1$			
14	$1.4 \pm 0.2$	1/6	$1.4 \pm 0.2$			
15	$0.8 \pm 0.1$	1.5/5	$1.1 \pm 0.1$	18/21		
16	$1.4 \pm 0.1$	7.4/7				
17	$1.7 \pm 0.2$	7/7				
18	$1.4 \pm 0.1$	8.3/7	$1.1 \pm 0.1$	32/16		
19	$1.1 \pm 0.1$	7/8				

TABLA IV.5

RESULTADOS DE LOS AJUSTES A LA EXPRESION  $K = K_0 N_B^a$

MULTIPLICIDAD DE LA INFECCION	a	$\chi^2/ND$
1/1000 a 1/250.000	$-0.65 \pm 0.12$	1.3/3
1/300 a 1/1000	$-0.84 \pm 0.09$	3/2
1/10 a 1/300	$-0.94 \pm 0.08$	20/3
10/1 a 1/10	$-0.97 \pm 0.05$	30/4
10/1 a 1/250.000	$-0.95 \pm 0.03$	60/17

TABLA IV.6

RESULTADOS DE LOS AJUSTES A LA EXPRESION  $N_F = N_{FO} e^{-KN_B^{1/3} t}$

TIPO DE AJUSTE Nº CURVA	I		III	
	$K \times 10^{-5}$	$x^2/ND$	$K \times 10^{-5}$	$x^2/ND$
5	$10 \pm 3$	0.5/4	$6.4 \pm 0.4$	42/48
8	$7 \pm 1$	1.5/6		
10	$6 \pm 1$	11/6		
12	$7 \pm 1$	3.1/6		
14	$6 \pm 1$	1.3/6		
16	$6 \pm 1$	6.3/7		
17	$6 \pm 1$	7/7		

TABLA IV.7

Nº fagos/ml  
(iniciales)

Nº bacterias/ml  
(iniciales)

1.1 x 10 <sup>3</sup>	8.9 x 10 <sup>6</sup>
2.2 x 10 <sup>4</sup>	"
4.4 x 10 <sup>5</sup>	"
8.9 x 10 <sup>6</sup>	"
8.1 x 10 <sup>3</sup>	2.4 x 10 <sup>7</sup>
4.4 x 10 <sup>5</sup>	"
3.2 x 10 <sup>6</sup>	"
2.4 x 10 <sup>7</sup>	"
1.8 x 10 <sup>8</sup>	"
1.3 x 10 <sup>9</sup>	"
3.2 x 10 <sup>6</sup>	6.6 x 10 <sup>7</sup>
2.4 x 10 <sup>7</sup>	"
1.8 x 10 <sup>8</sup>	"
1.3 x 10 <sup>9</sup>	"
3.2 x 10 <sup>6</sup>	1.8 x 10 <sup>8</sup>
2.4 x 10 <sup>7</sup>	"
1.8 x 10 <sup>8</sup>	"
1.3 x 10 <sup>9</sup>	"
3.2 x 10 <sup>6</sup>	4.8 x 10 <sup>8</sup>
2.4 x 10 <sup>7</sup>	"
1.8 x 10 <sup>8</sup>	"
1.3 x 10 <sup>9</sup>	"
8.1 x 10 <sup>3</sup>	1.3 x 10 <sup>9</sup>
4.4 x 10 <sup>5</sup>	"
2.4 x 10 <sup>7</sup>	"
1.3 x 10 <sup>9</sup>	"

Para cada una de las 26 situaciones iniciales que figuran en la tabla se han realizado 5 generaciones a los valores de eficacia: 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 (Total 130 generaciones).

TABLA IV.8

Nº bact/ml (iniciales)	Nº fagos/ml (iniciales)	MI	$Ef_{TEO}$	$Ef_{AJ}$ (NB 10%)	$Ef_{AJ}$ (NB 4%)	$2^* \times 1$	$2^* \times 2$
$1.1 \times 10^8$	$8.0 \times 10^8$	7.3/1	0.13	$0.15 \pm 0.03$	$0.11 \pm 0.01$	23	30
$1.1 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8$	4.4/1	0.22	$0.20 \pm 0.04$	$0.22 \pm 0.02$	28	33
$4.0 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$	3.5/1	0.26	$0.22 \pm 0.07$	$0.26 \pm 0.03$	31	39
$2.9 \times 10^8$	$8.0 \times 10^8$	2.7/1	0.34	$0.36 \pm 0.05$	$0.34 \pm 0.02$	29	32
$1.1 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$	2.1/1	0.39	$0.37 \pm 0.09$	$0.37 \pm 0.04$	21	41
$1.1 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	1.6/1	0.49	$0.4 \pm 0.1$	$0.49 \pm 0.05$	24	27
$4.0 \times 10^7$	$5.1 \times 10^7$	1.3/1	0.53	$0.6 \pm 0.2$	$0.57 \pm 0.08$	31	26
$2.9 \times 10^8$	$3.8 \times 10^8$	1.3/1	0.54	$0.5 \pm 0.1$	$0.47 \pm 0.05$	29	28
$4.0 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	1/1.3	0.71	$0.6 \pm 0.3$	$0.7 \pm 0.1$	20	41
$1.8 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	1/1.6	0.75	$0.9 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.1$	33	40
$4.0 \times 10^7$	$4.3 \times 10^6$	1/9.3	0.94	$1 \pm 0.5$	$0.8 \pm 0.3$	23	31

\* En todos los casos 39 grados de libertad

TABLA IV. 9



## DESCRIPCION DE FIGURAS

- FIGURA IV.1 Error en la densidad óptica en función del valor de la densidad óptica. La línea continua corresponde al ajuste descrito en el texto.
- FIGURA IV.2 Número de bacterias y errores correspondientes para valores de densidad óptica inferiores a 0.7 u.o/ml. La línea continua corresponde al ajuste descrito en el texto.
- FIGURA IV.3 Densidades ópticas y errores en función del tiempo correspondientes a cuatro curvas de crecimiento bacteriano.
- FIGURA IV.4 Logaritmo del número de bacterias y errores en función del tiempo, correspondientes a cuatro curvas de crecimiento bacteriano. Las líneas continuas corresponden al ajuste simultáneo mencionado en el texto.
- FIGURAS IV.5 a IV.14 Evolución en función del tiempo del logaritmo neperiano del número de fagos libres/ml (puntos negros) y error. Las líneas discontinua y continua corresponden a las proyecciones de los ajustes individuales a las expresiones - IV.3.1 y IV.3.3 respectivamente. La evolución en función - del tiempo del número de placas de lisis total (ver texto) se representa con puntos blancos con la correspondiente barra de error.
- FIGURAS IV.15 a IV.24 Logaritmo neperiano del número de fagos libres y error en función del tiempo. Las proyecciones de los ajustes simultáneos descritos en el texto a las expresiones - IV.3.1 y IV.3.3 se representan, respectivamente, por líneas discontinuas y continuas.
- FIGURA IV.25 Logaritmo neperiano y error del parámetro K (obtenido tras los ajustes a la expresión IV.3.1) en función del logaritmo neperiano del número de bacterias. La línea continua corresponde a la proyección del ajuste a la expresión IV.3.2.

FIGURA IV.26 Evolución del logaritmo neperiano de K y error obtenidos - tras el ajuste a la expresión IV.3.1 en función del logaritmo neperiano del número de bacterias inicial al que corresponden. Las líneas continuas corresponden a la proyección de los ajustes a la expresión IV.3.2 para los cuatro grupos de datos establecidos. Se especifican las multiplicidades de infección (M.I.) a que corresponden los datos ajustados.

FIGURA IV.27 Evolución del logaritmo neperiano de K y error, procedente - de los ajustes individuales a la expresión IV.3.3, en función del logaritmo neperiano del número de bacterias inicial. Las multiplicidades de infección a que corresponden se especifican en el texto.

FIGURA IV.28 Evolución en función del tiempo del logaritmo neperiano del - número de placas de lisis correspondiente a las muestras sin filtrar (ver texto) (corresponden a las mismas experiencias de medida de fagos libres en función del tiempo que se muestra - en las figuras IV.29 y IV.30).

FIGURAS IV.29 y IV.30 Logaritmo neperiano del número de fagos libres/ml y error en función del tiempo. Las líneas continuas corresponden a las proyecciones de los ajustes individuales (figura - IV.29) y simultáneos (figura IV.30) a la expresión IV.3.3.

FIGURA IV.31 Logaritmo neperiano del número de bacterias en función del - tiempo (puntos) correspondientes a la generación teórica descrita en el texto para las eficacias y multiplicidades de infección que se indican. Las líneas continuas corresponden al crecimiento bacteriano en ausencia de fagos.

FIGURAS IV.32 y IV.33 Logaritmo neperiano del número de bacterias y error ( $\approx 10\%$ ) en función del tiempo. Las líneas discontinuas corresponden a las proyecciones de los ajustes referidos en el texto y las continuas al crecimiento bacteriano en ausencia de fagos. La eficacia teórica ( $Ef_{TEO}$ ) y ajustada ( $Ef_{AJ}$ ) que se especifica en todas ellas permite identificar, en la tabla - (IV.9), la situación inicial de número de fagos y bacterias a que corresponden, así como el valor del  $\chi^2$  obtenido.

FIGURAS IV.34 a IV.36 Logaritmo neperiano del número de bacterias y -  
error en función del tiempo. Las líneas continuas mues-  
tran la proyección del ajuste referido en el texto.

La eficacia teórica ( $Ef_{TEO}$ ) es la que corresponde a las  
multiplicidades de infección a las que se realizó la expe-  
rimentación. Se muestran los valores obtenidos tras el -  
ajuste para la Eficacia ( $Ef_{AJ}$ ) y la relación  $\chi^2/ND$ .

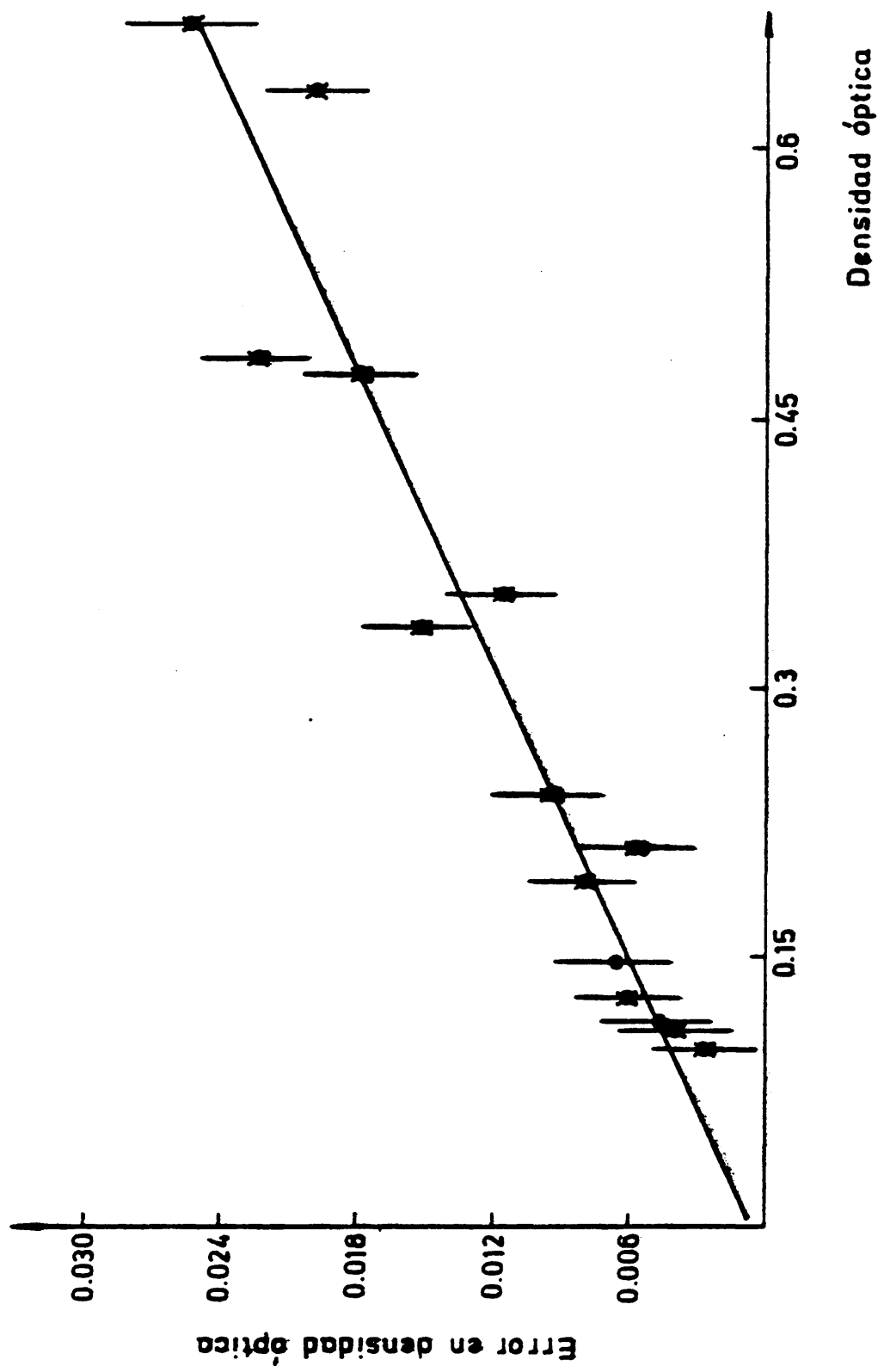


FIG. IV - I

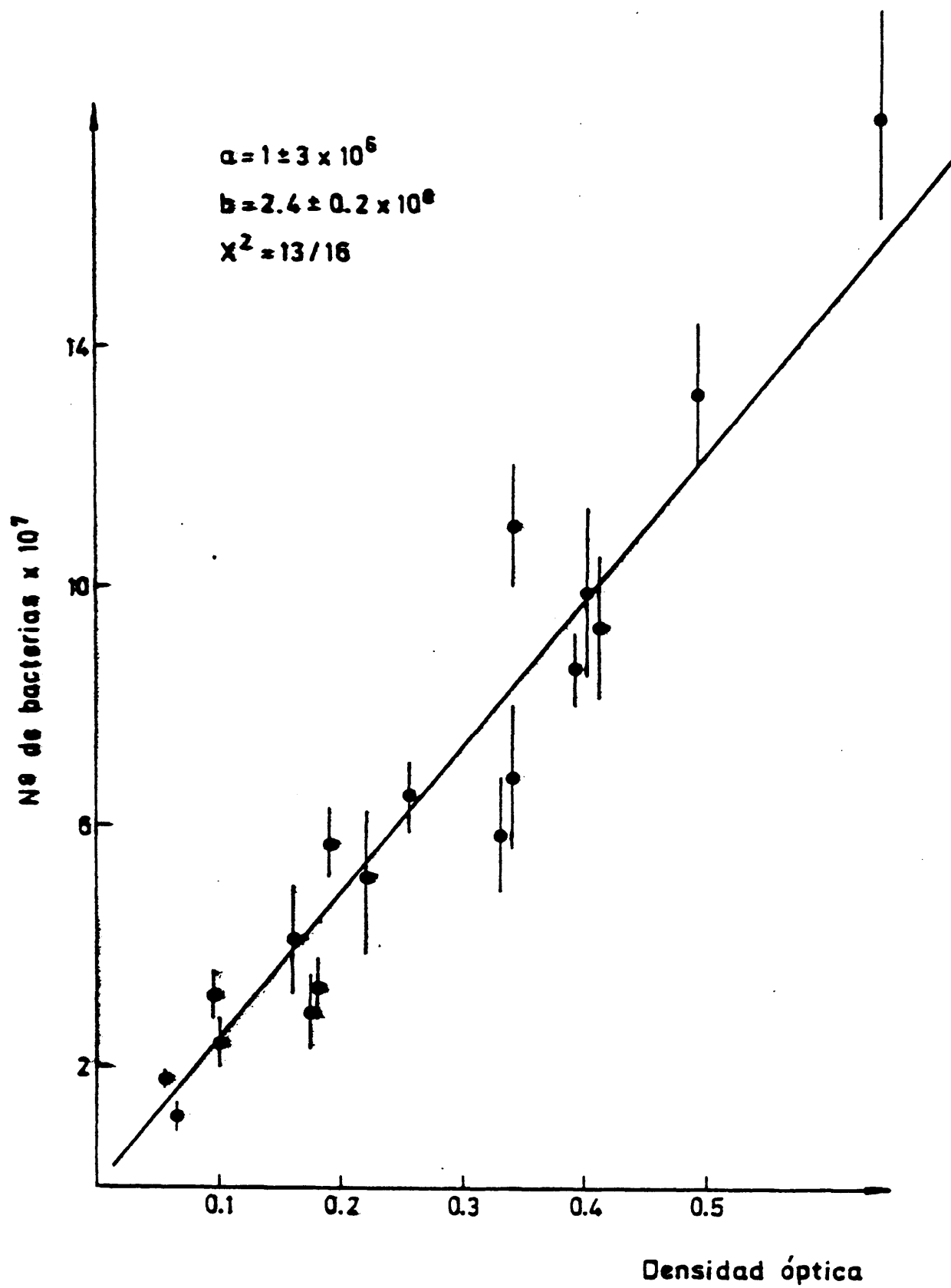


FIG. IV-2

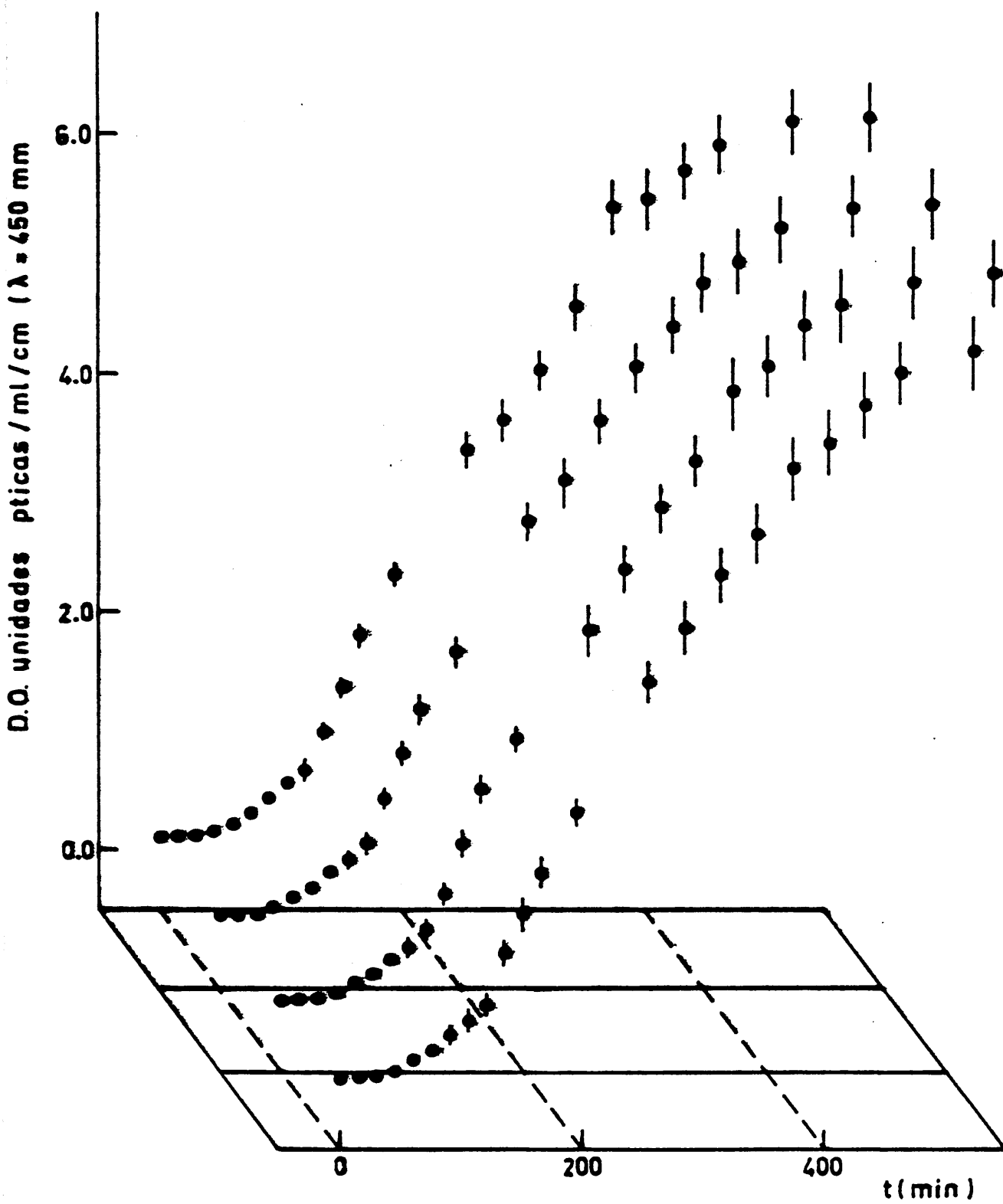


FIG IV-3

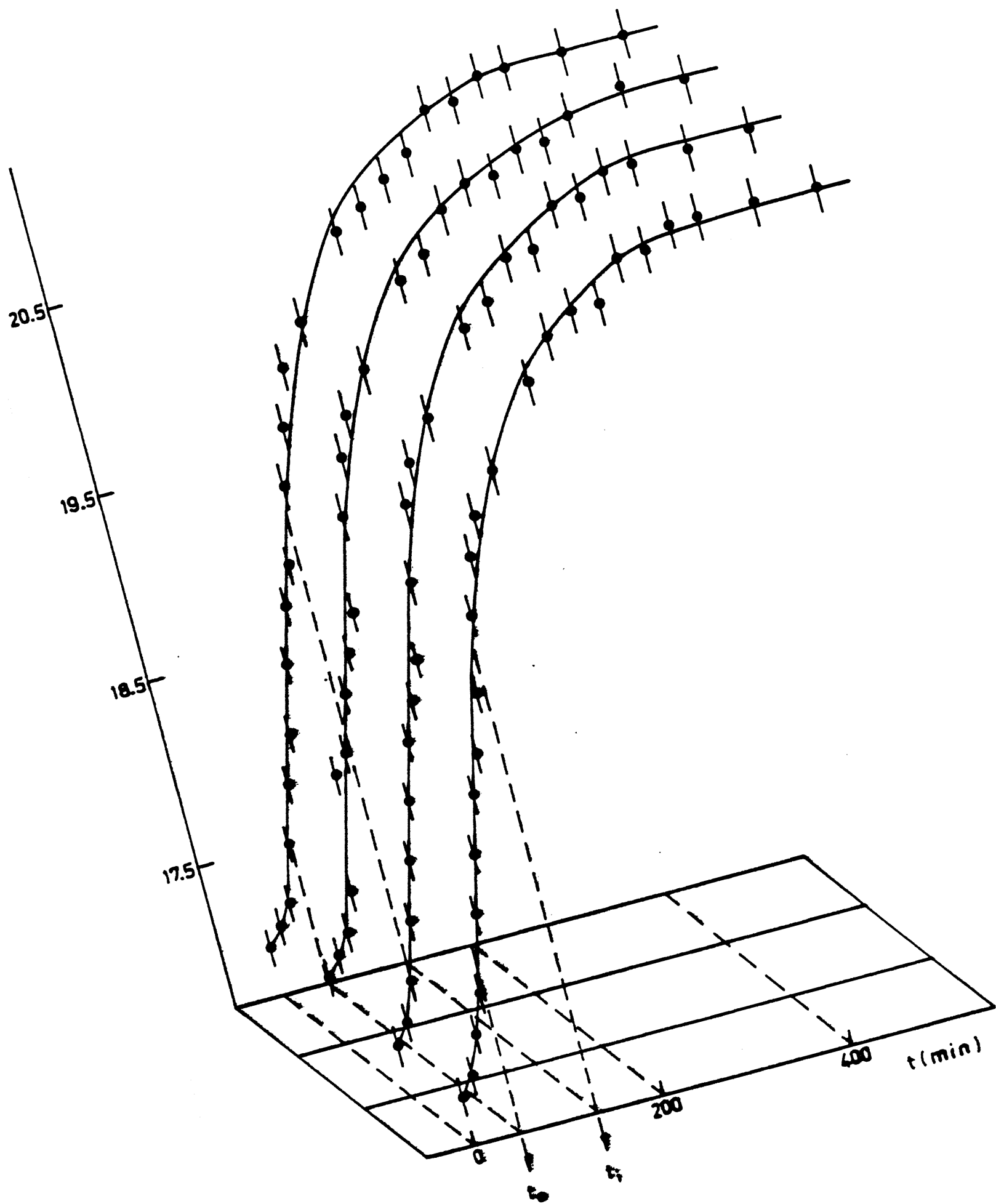
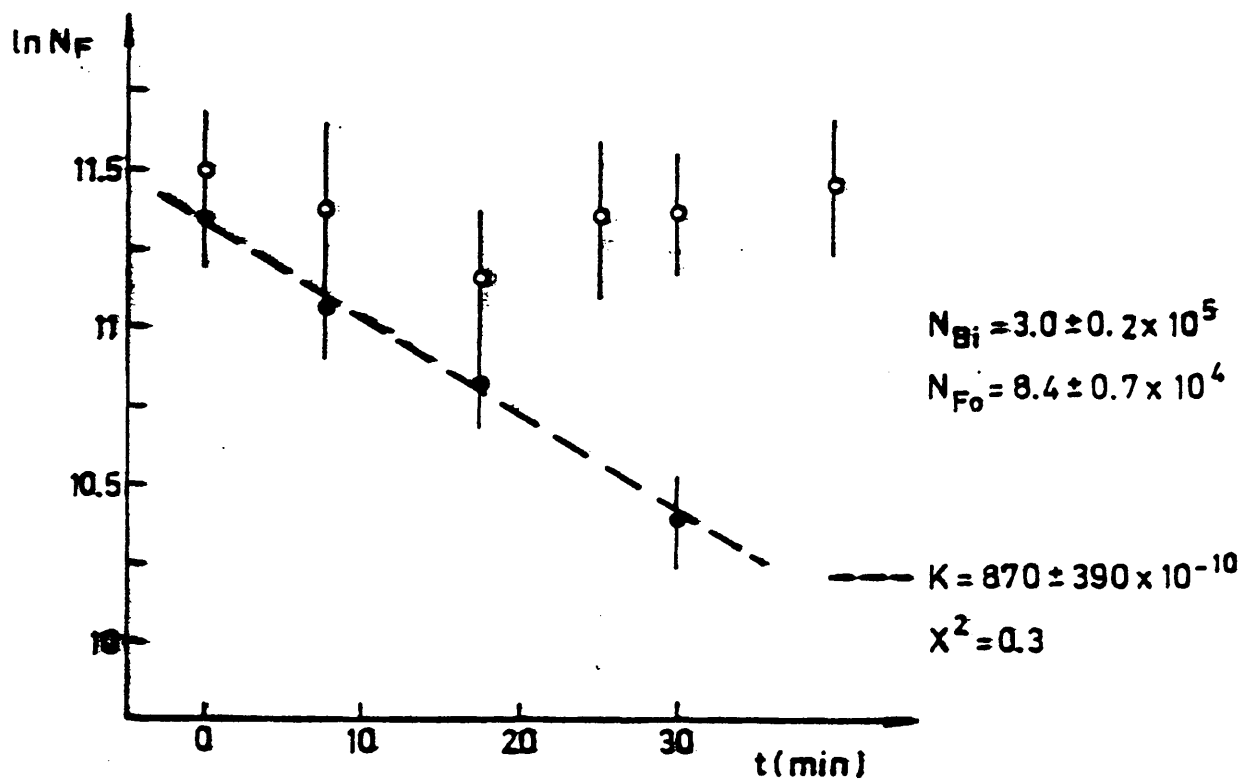
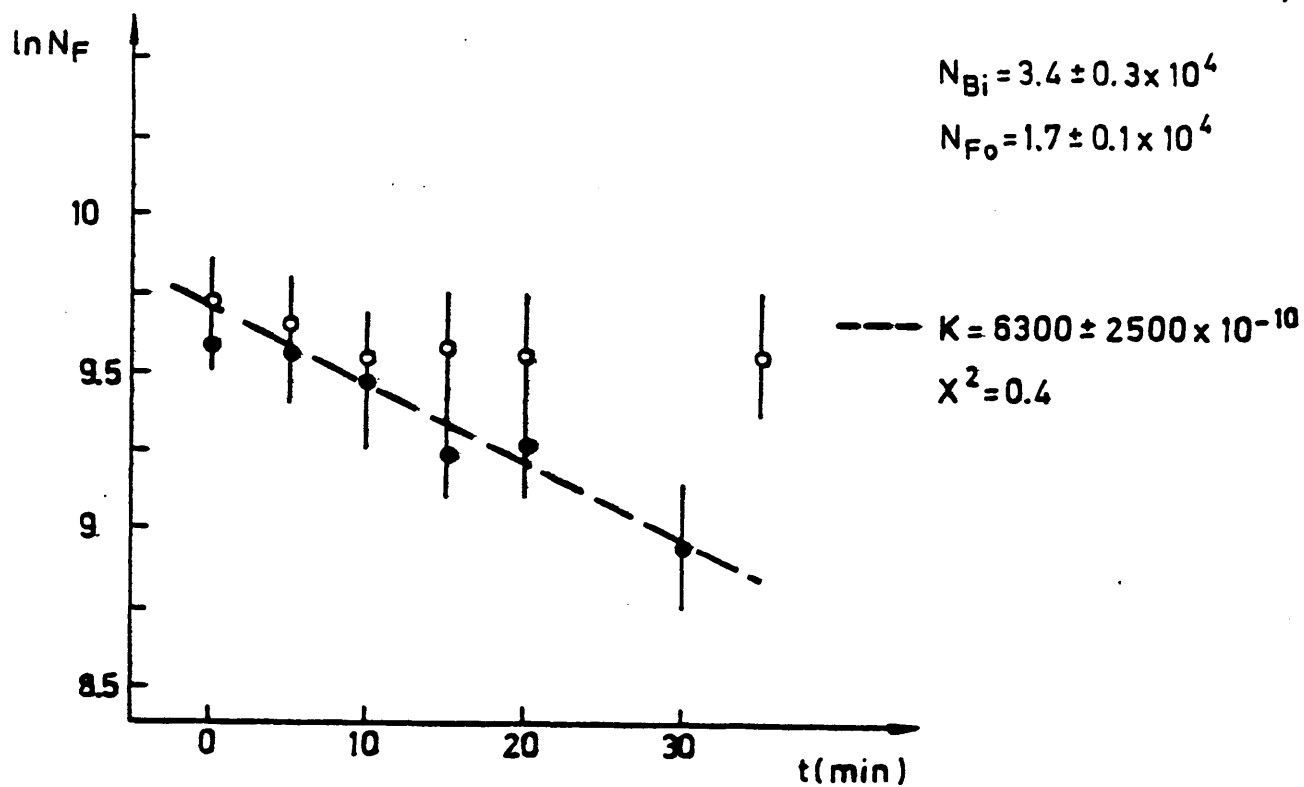
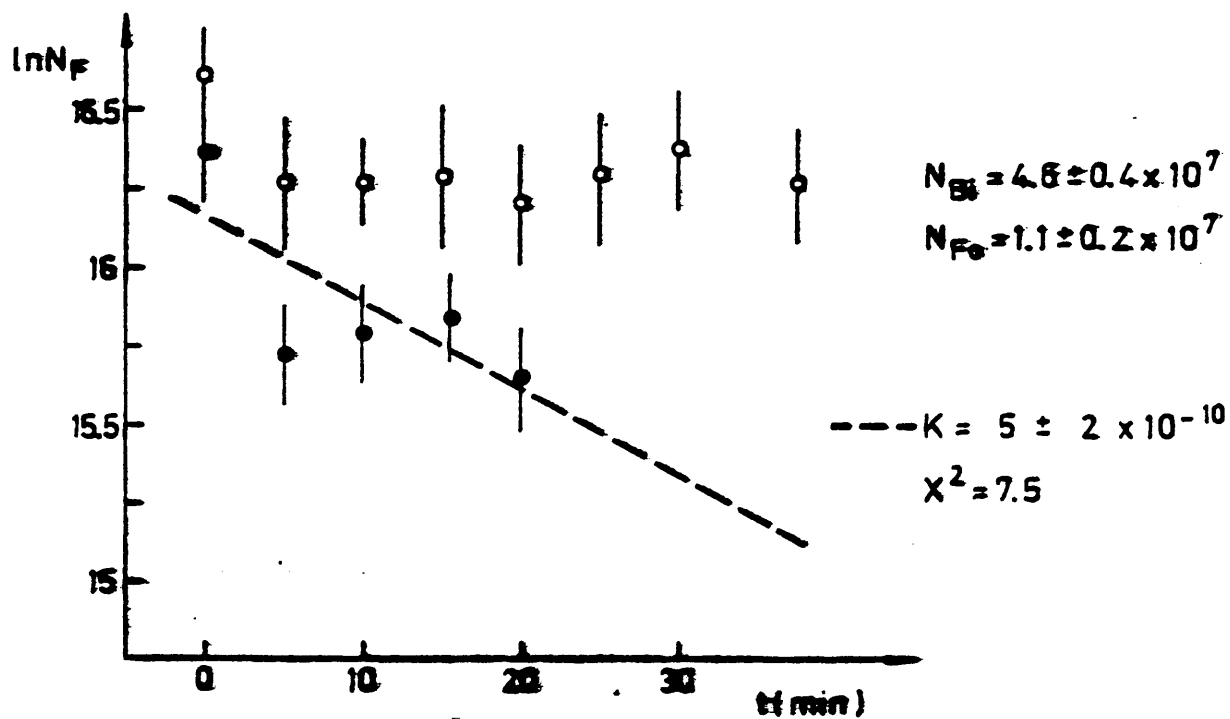
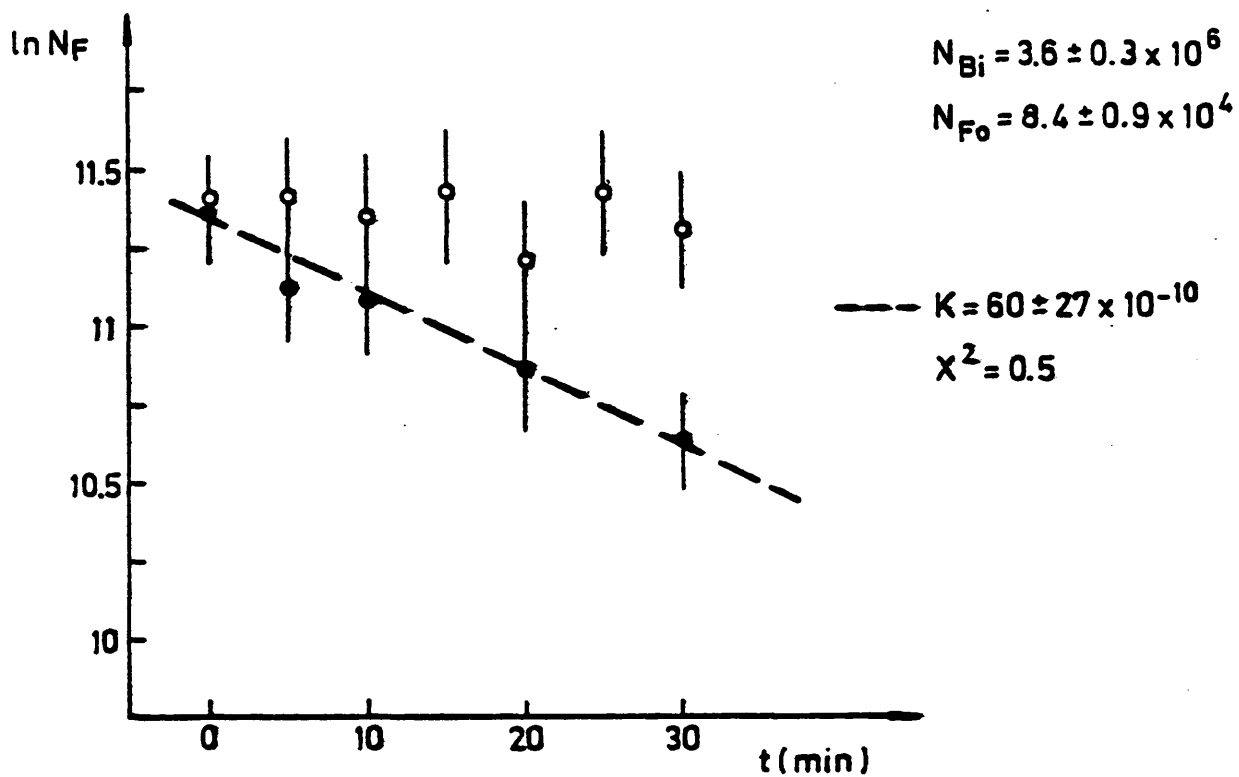


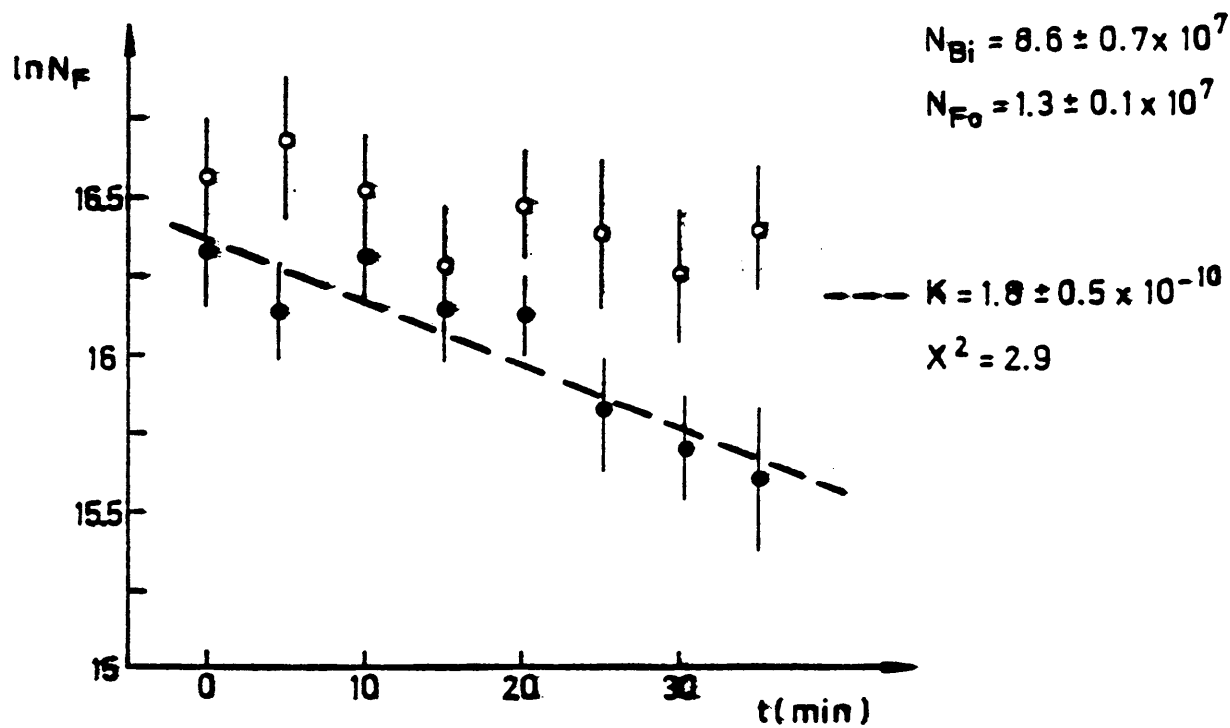
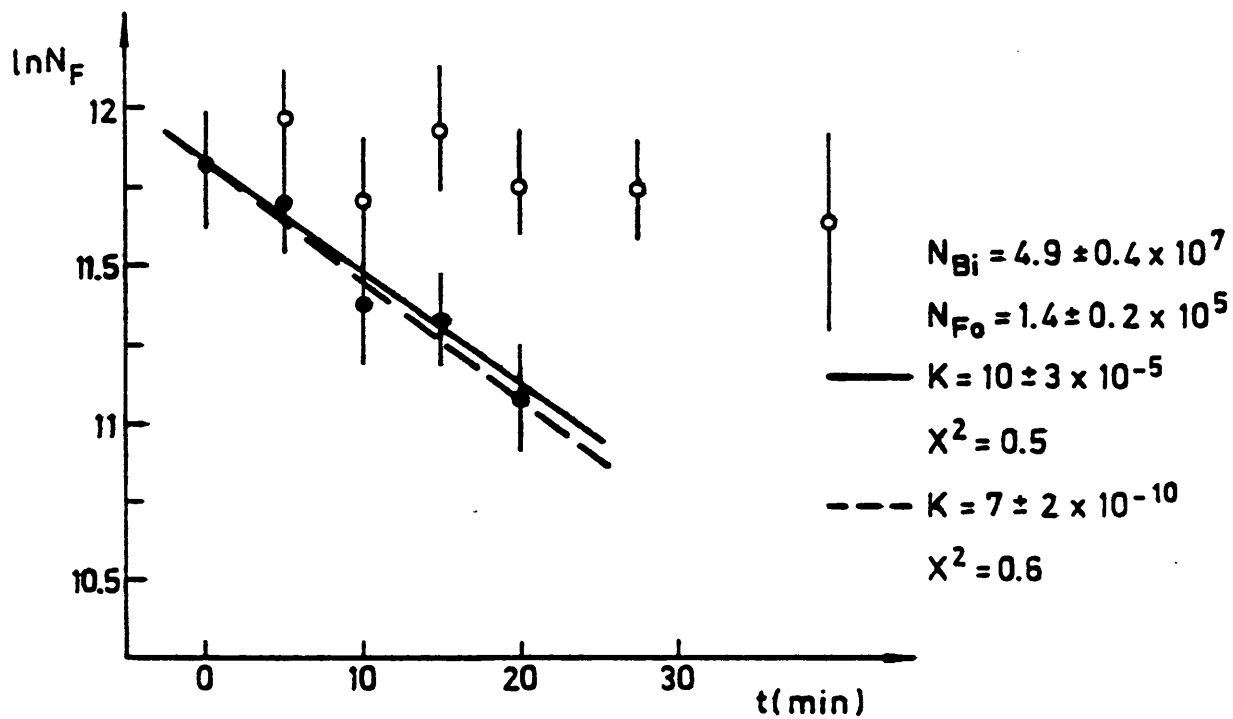
FIG IV-6

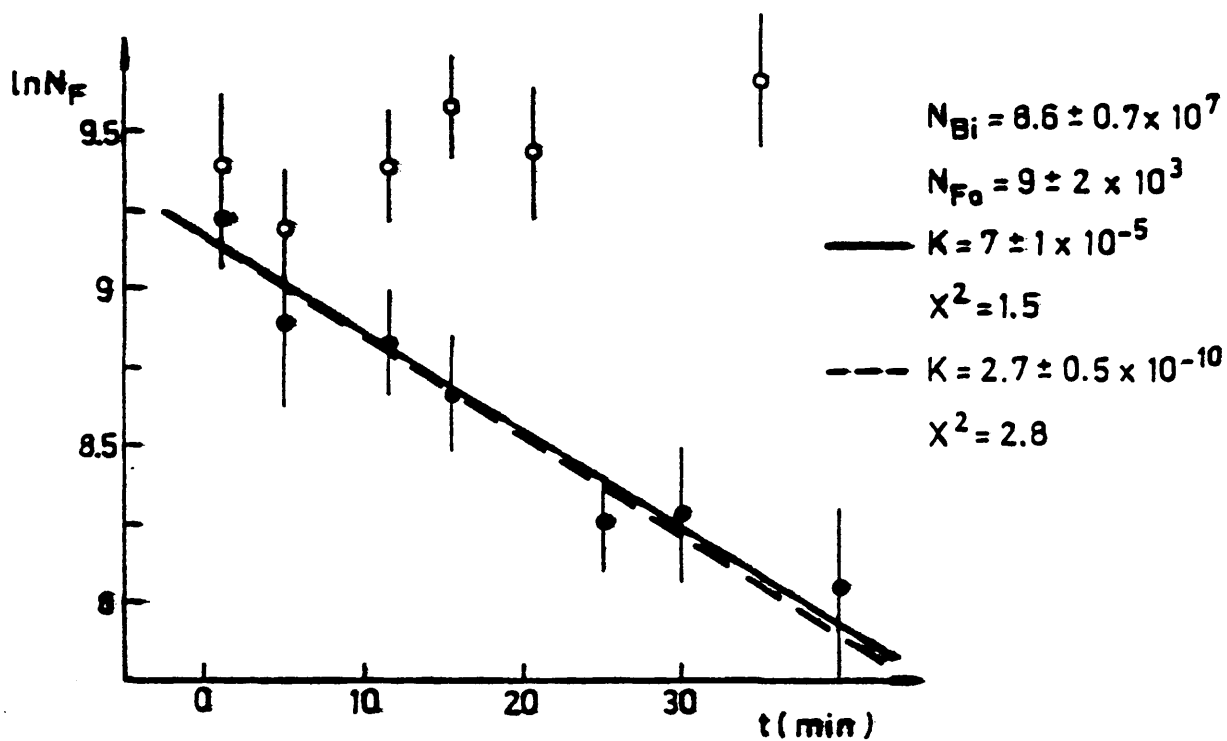
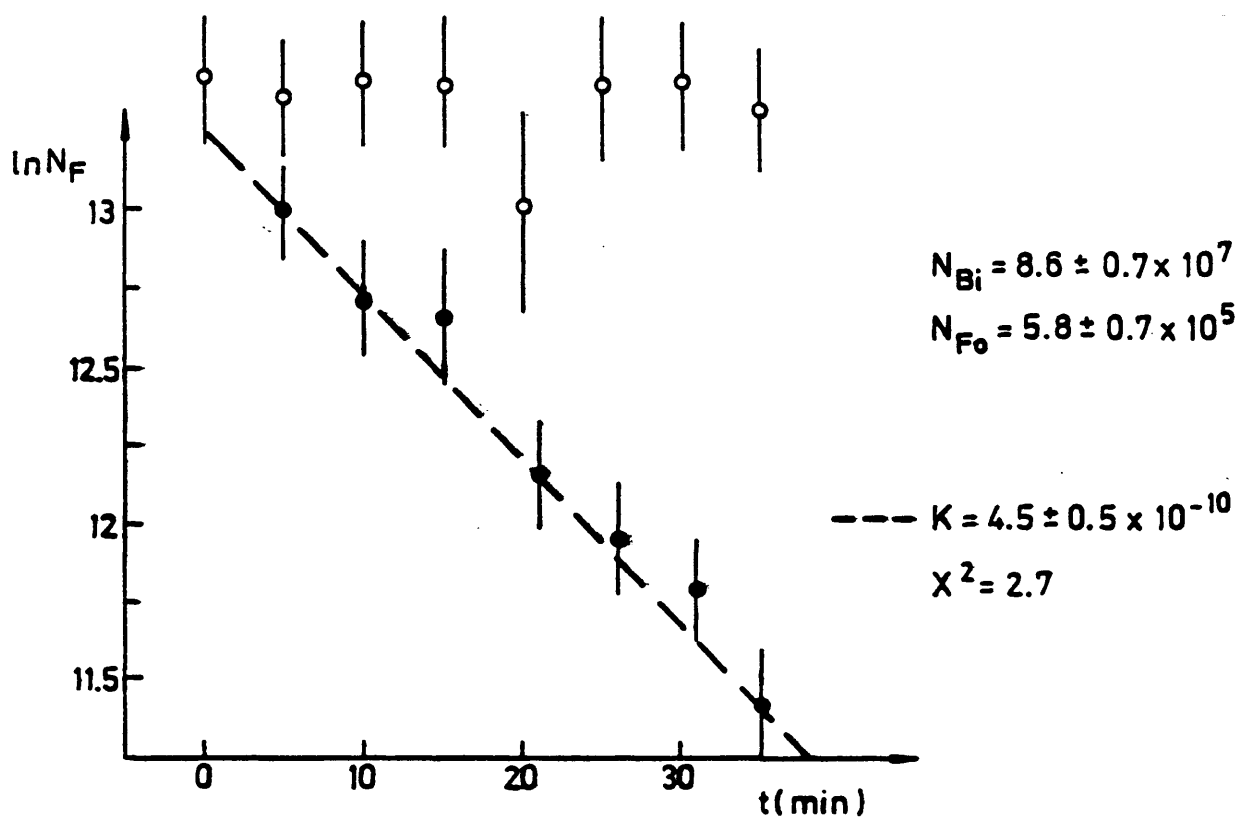


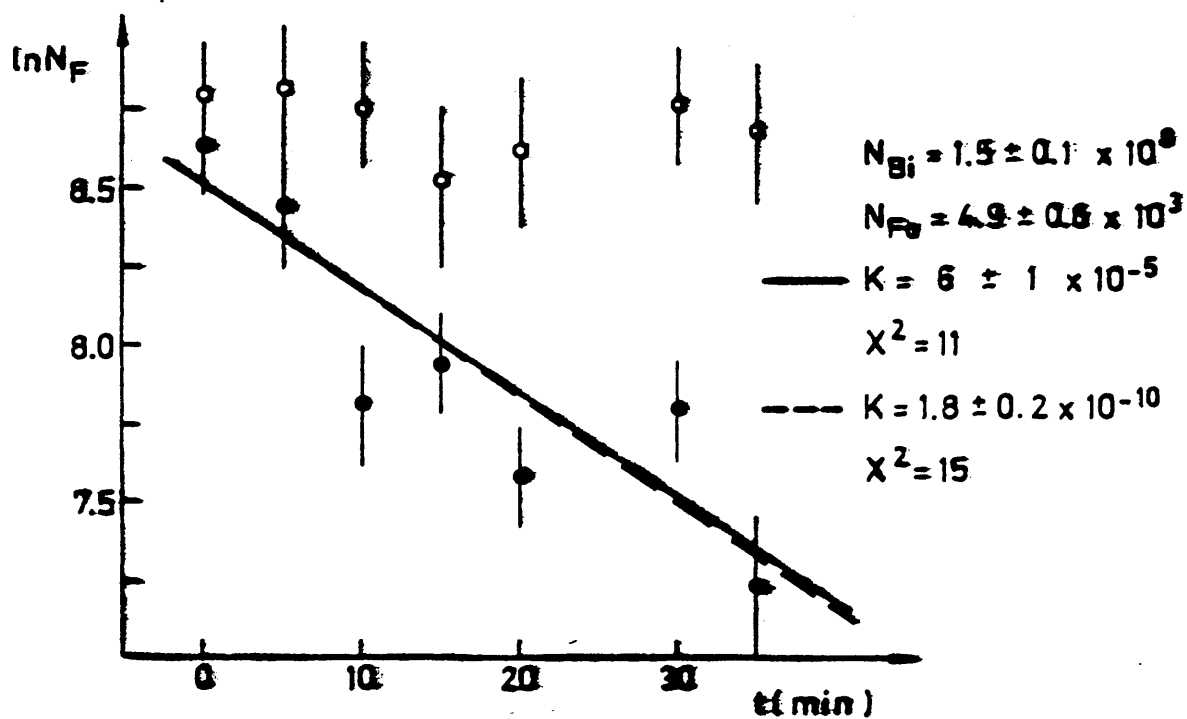
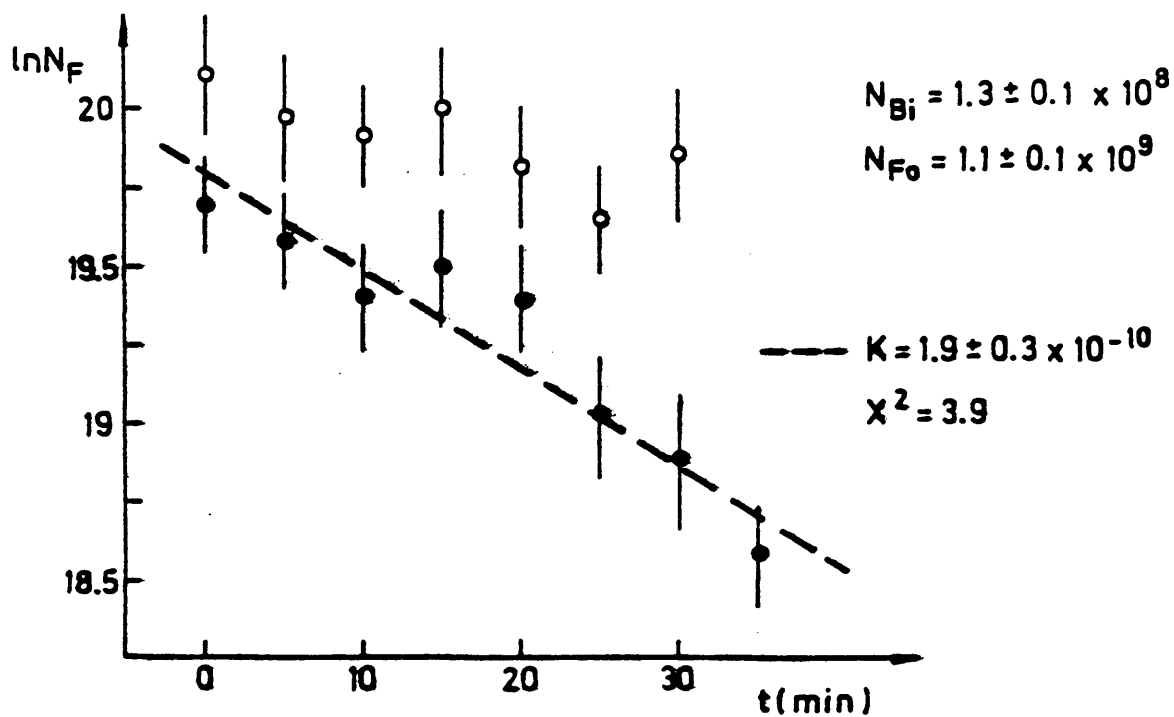
**FIG. IV-5**

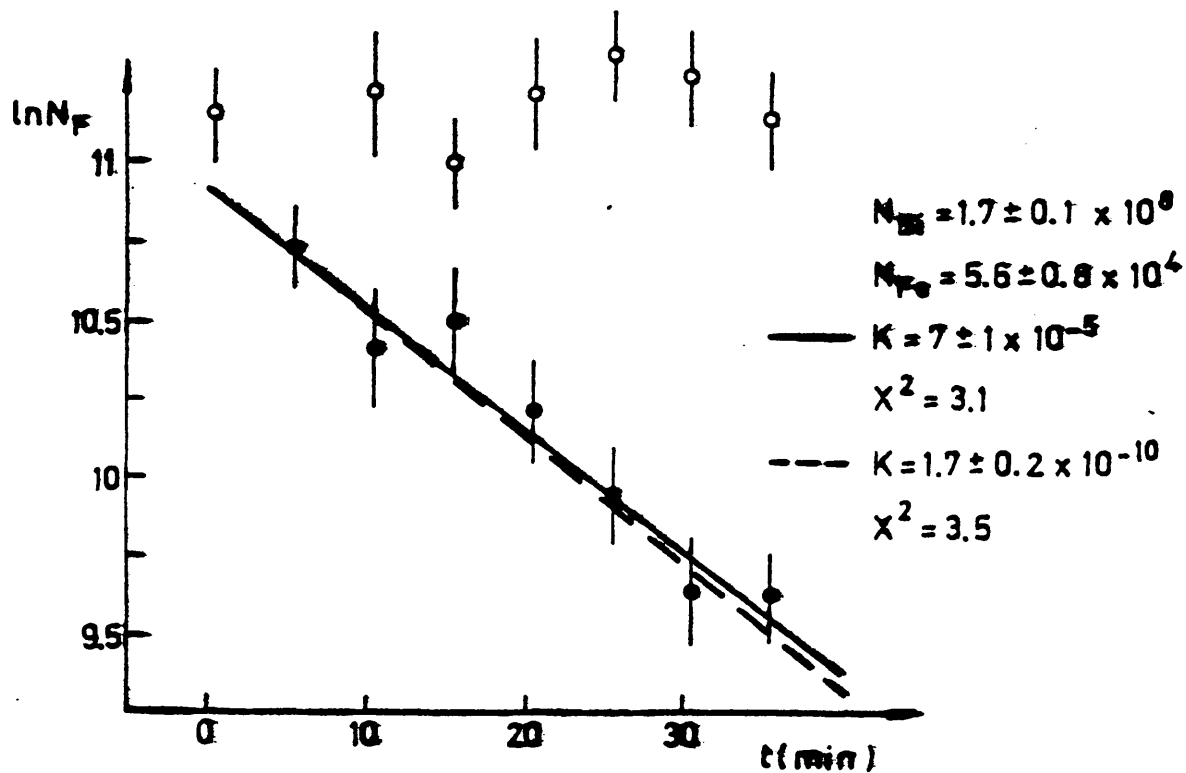
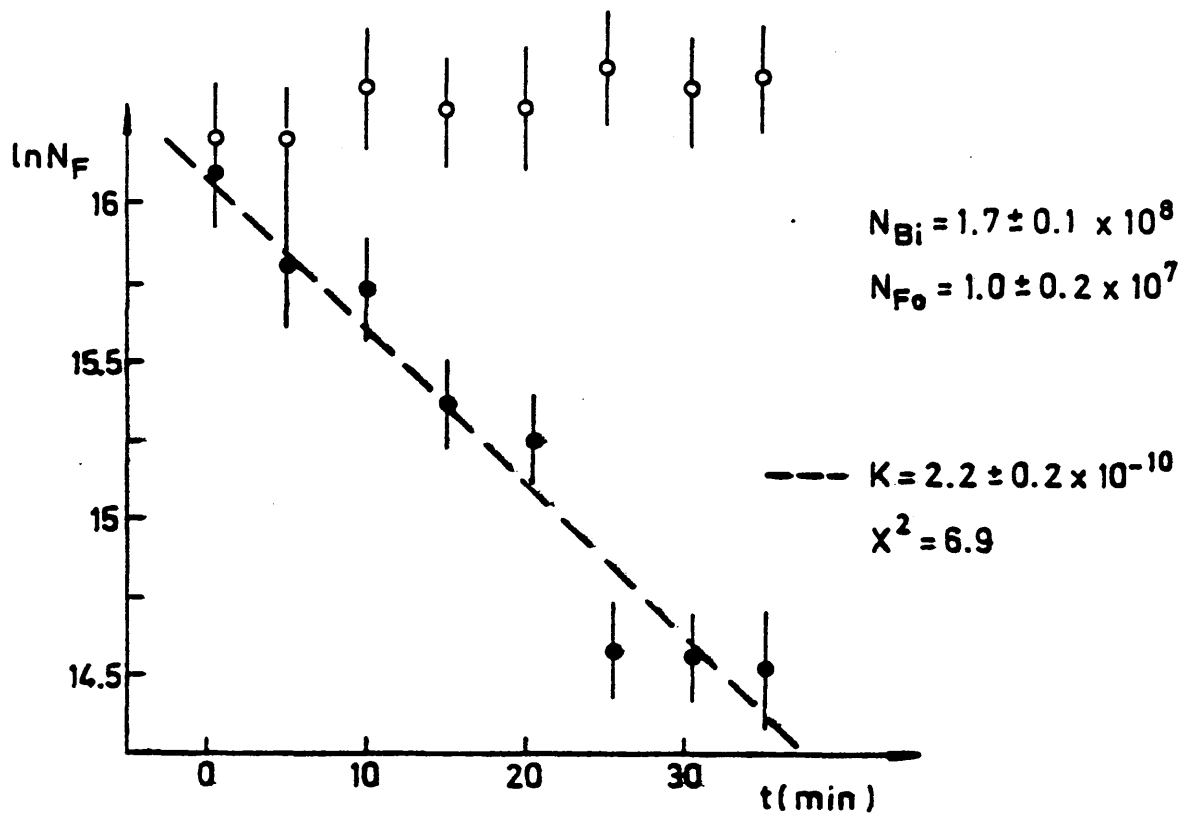


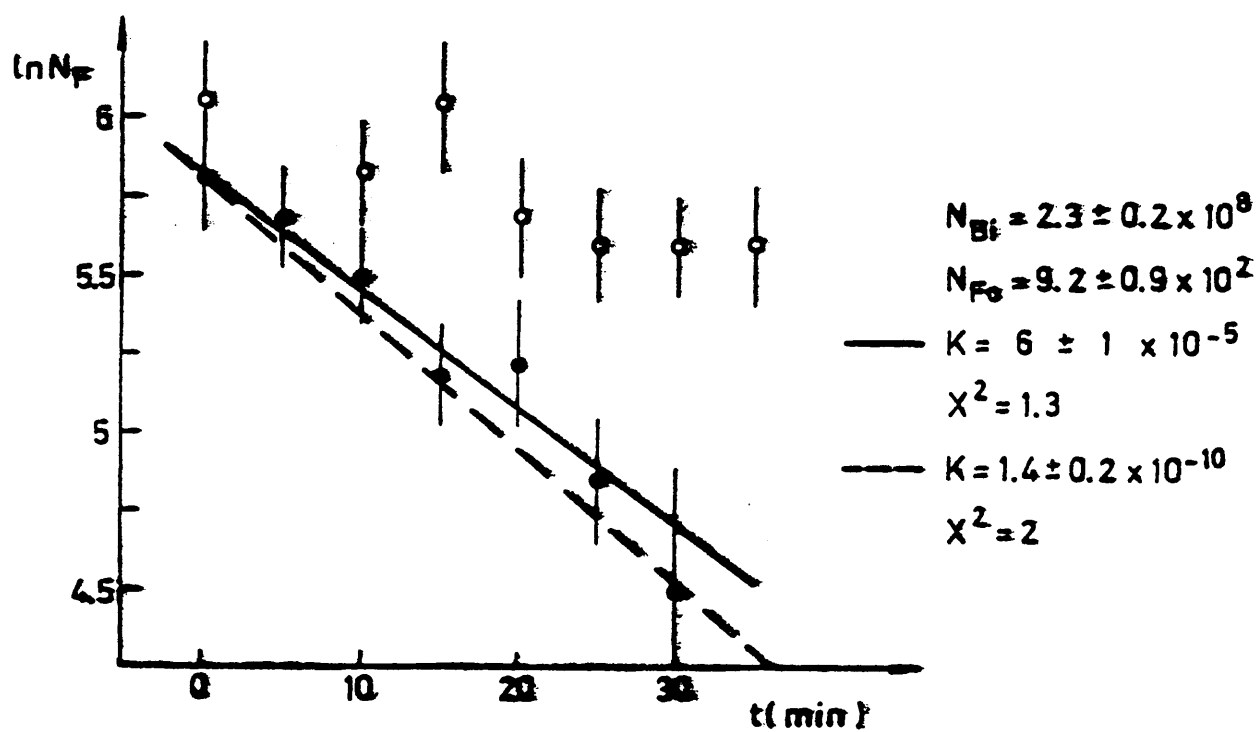
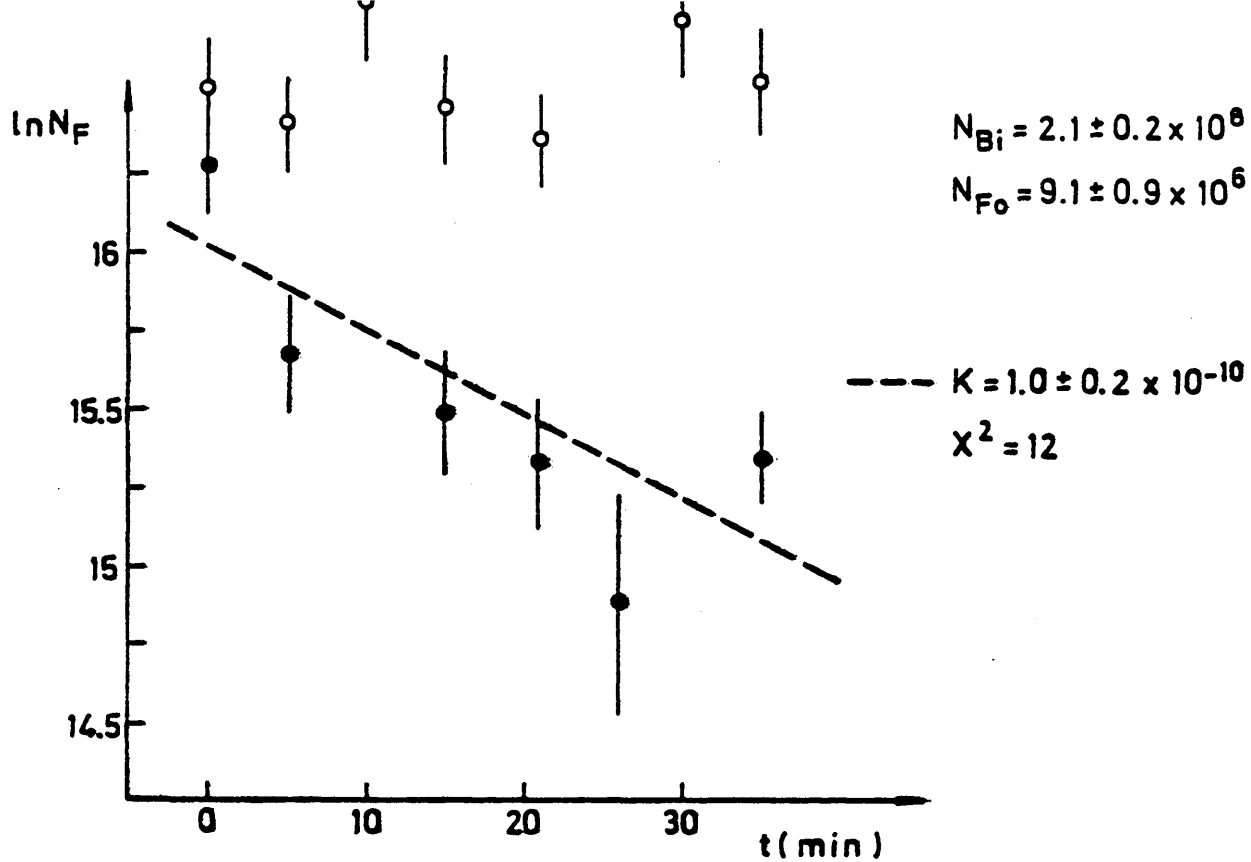


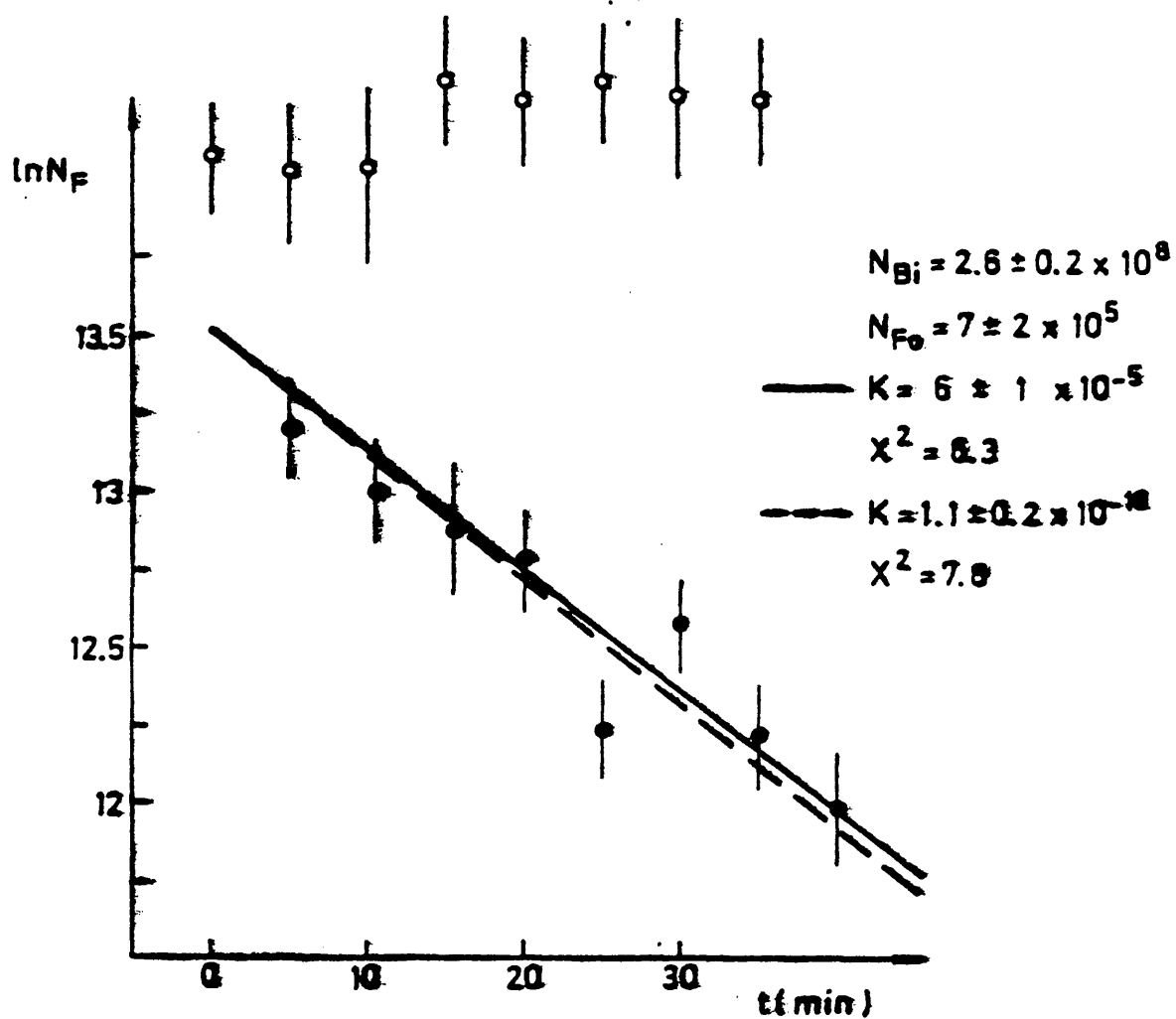
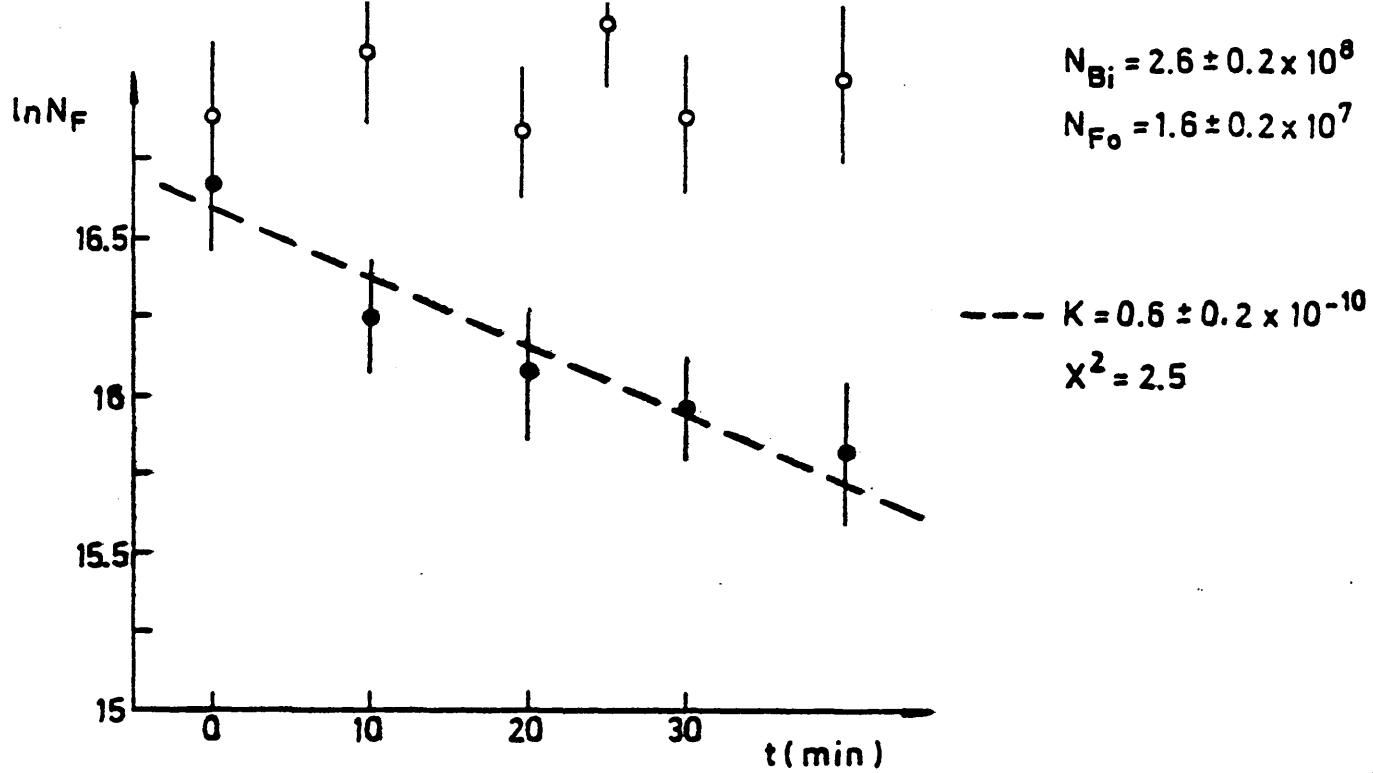












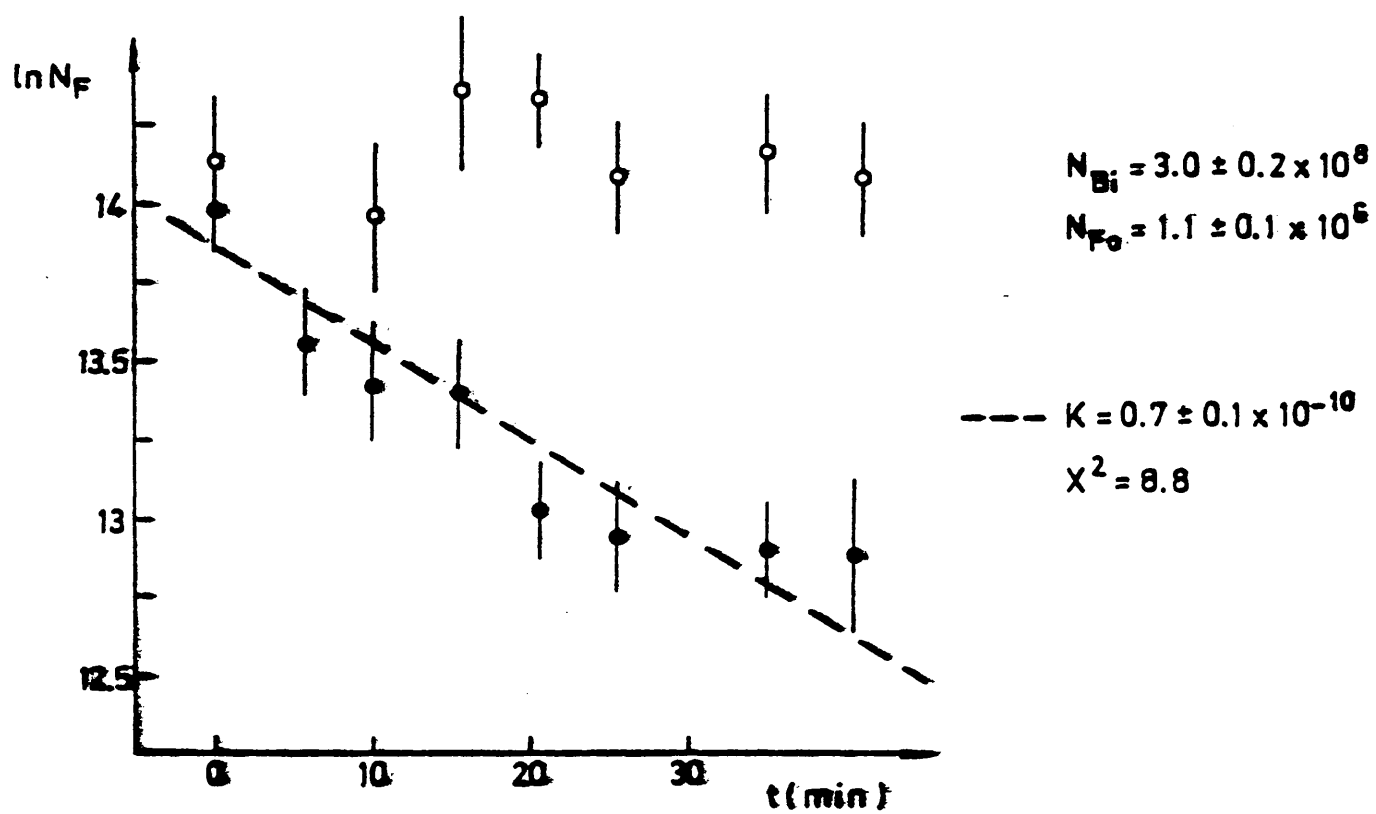
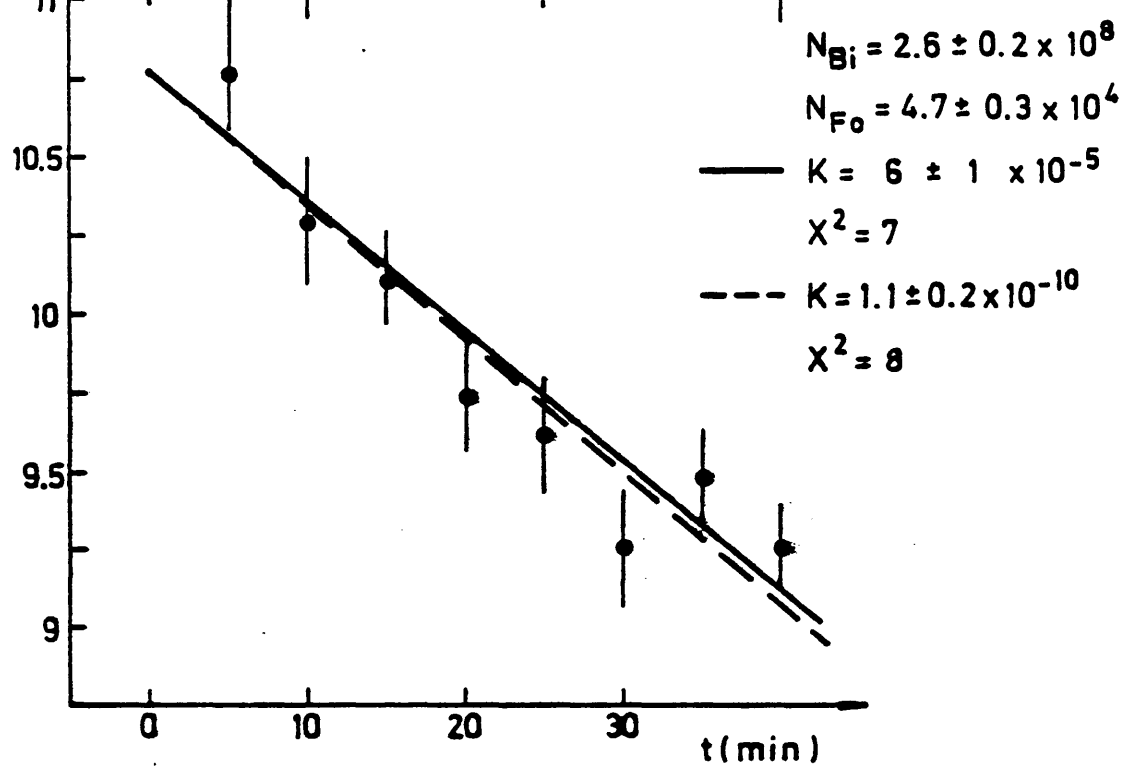


FIG. IV-13



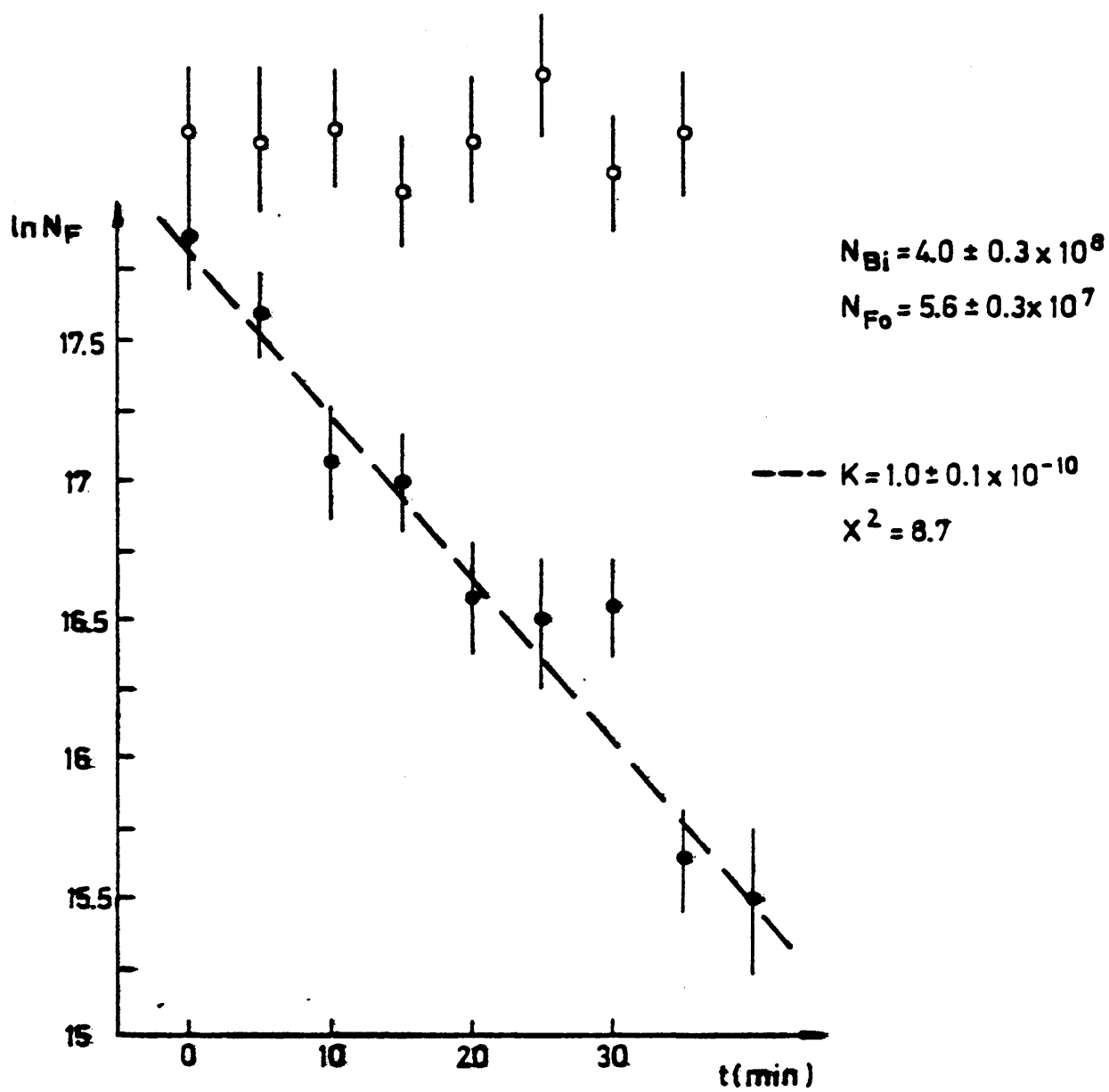


FIG. IV-14

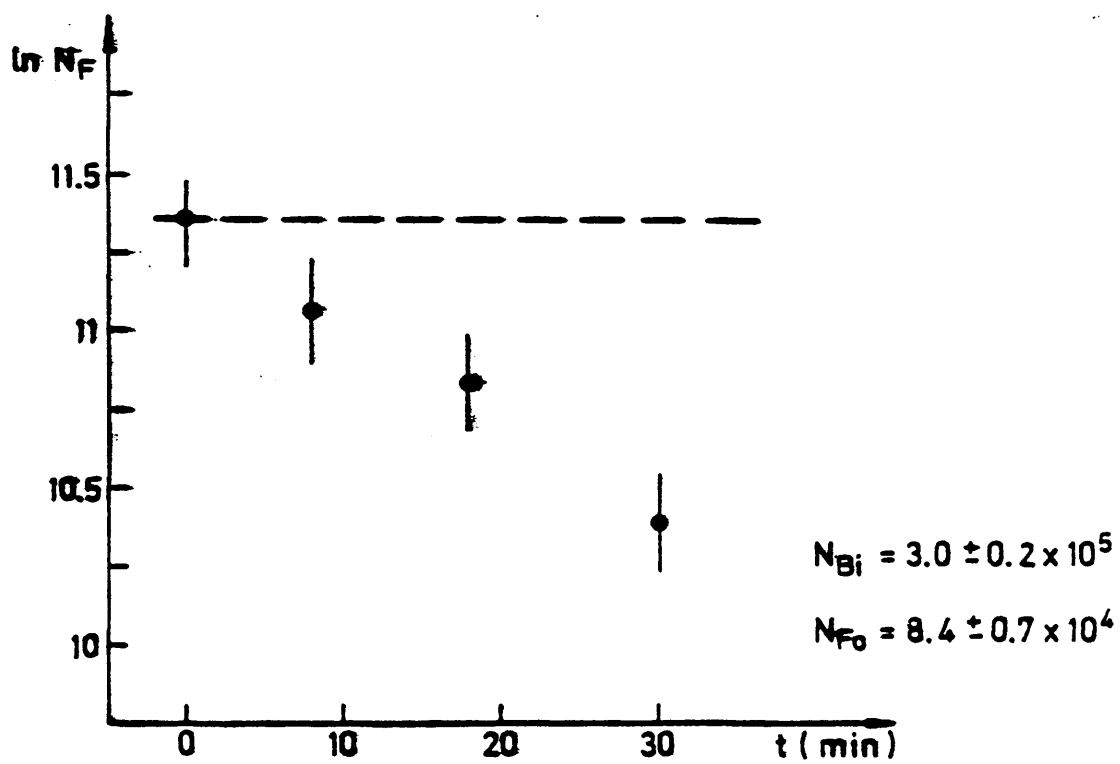
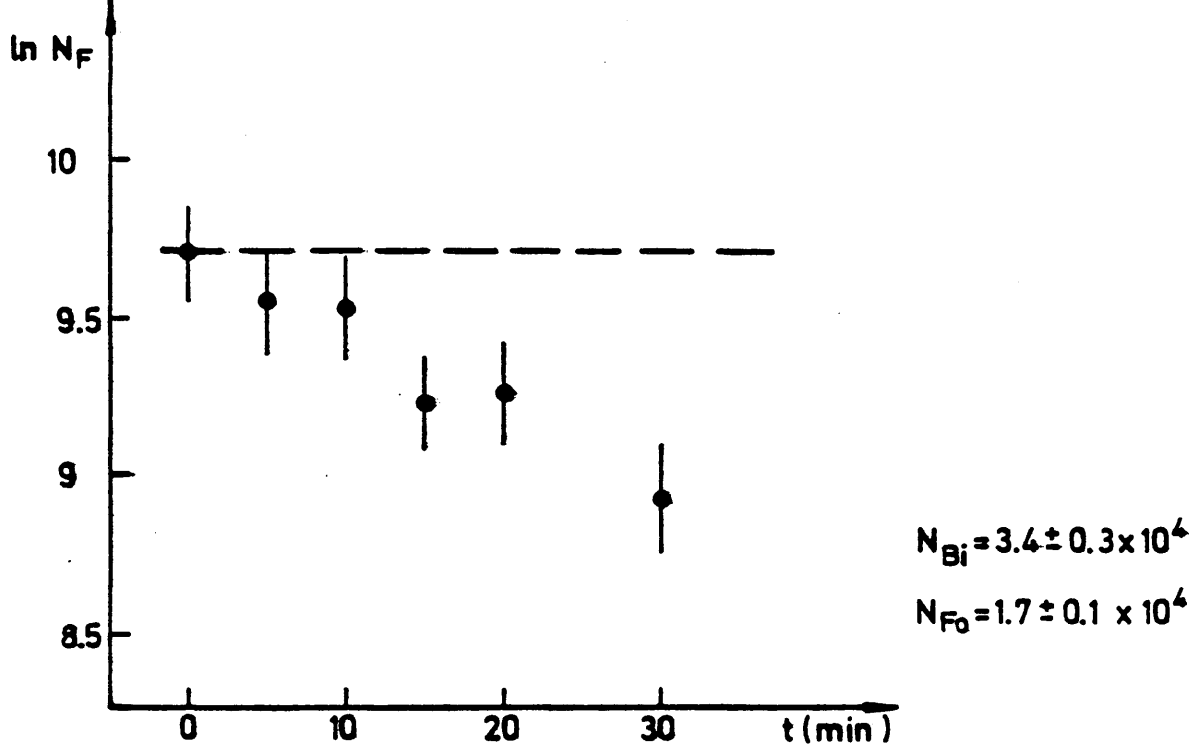
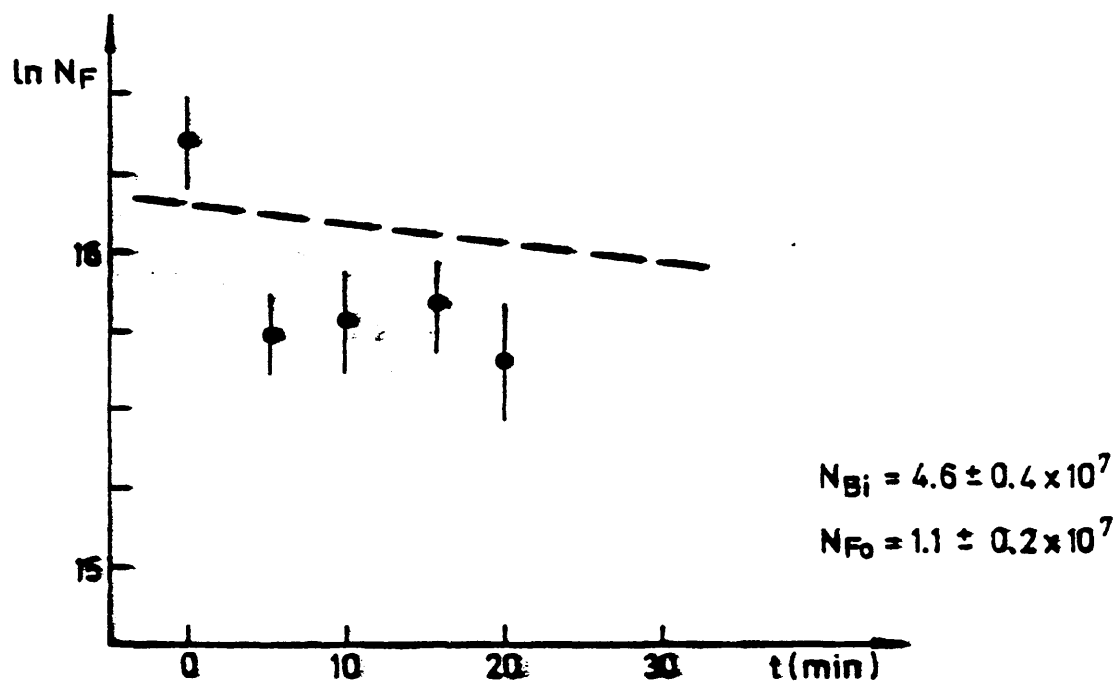
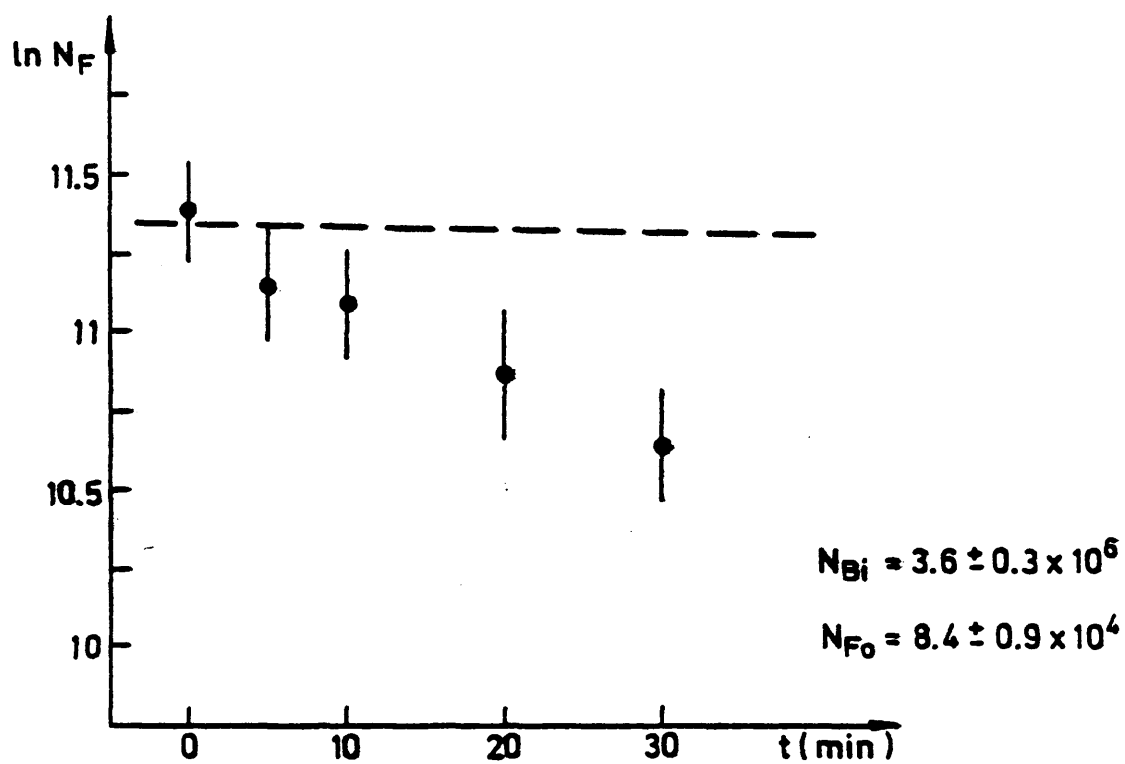


FIG. IV-15



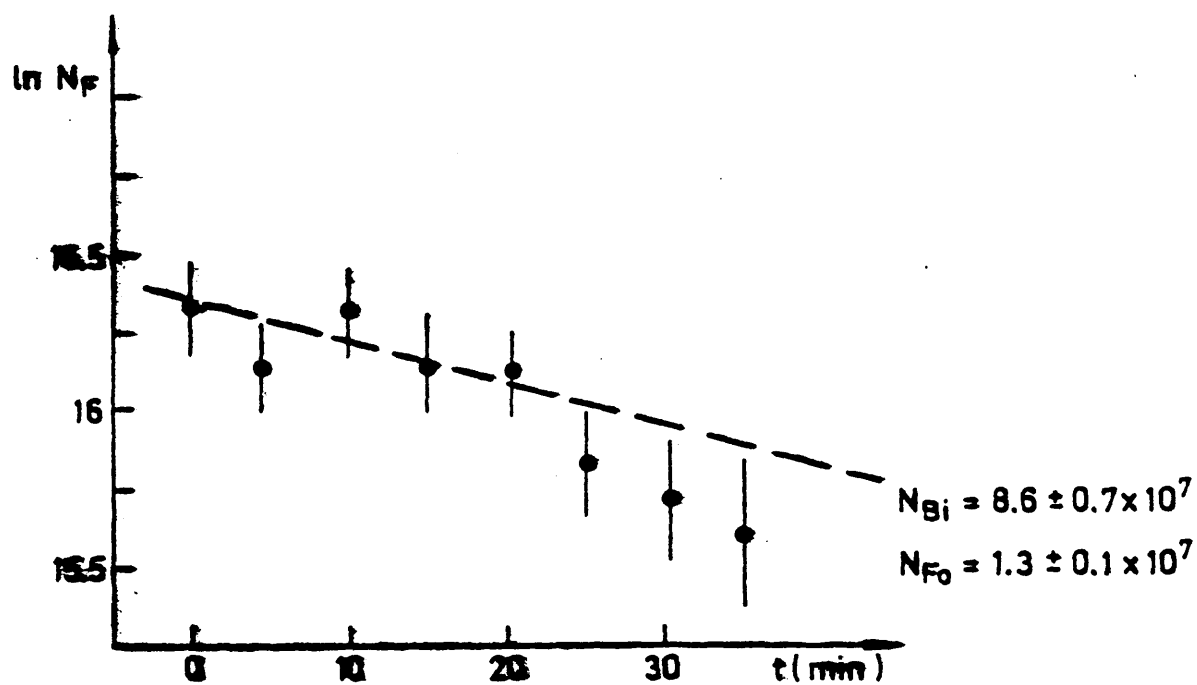
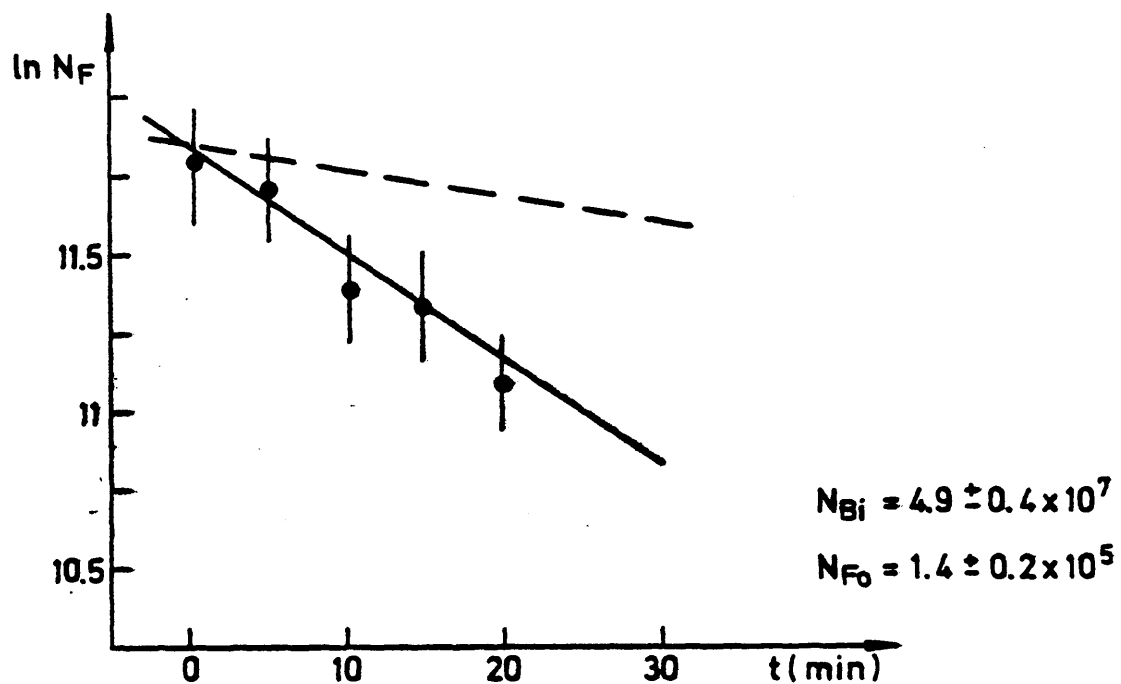


FIG. 10-17

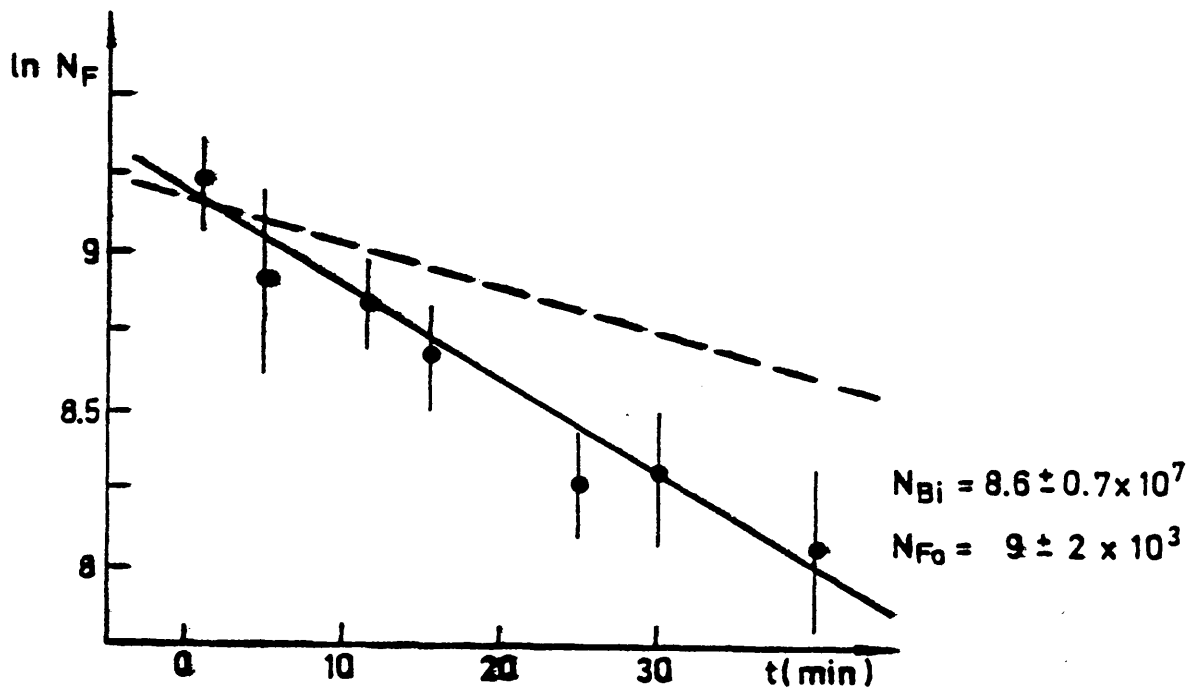
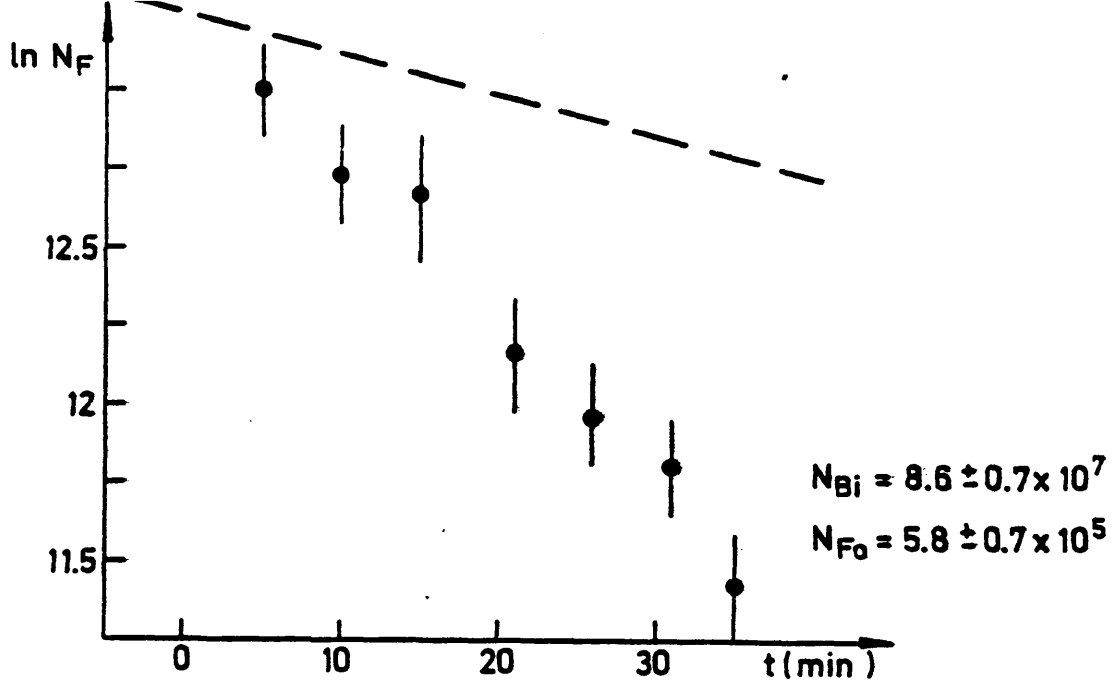


FIG IV-18

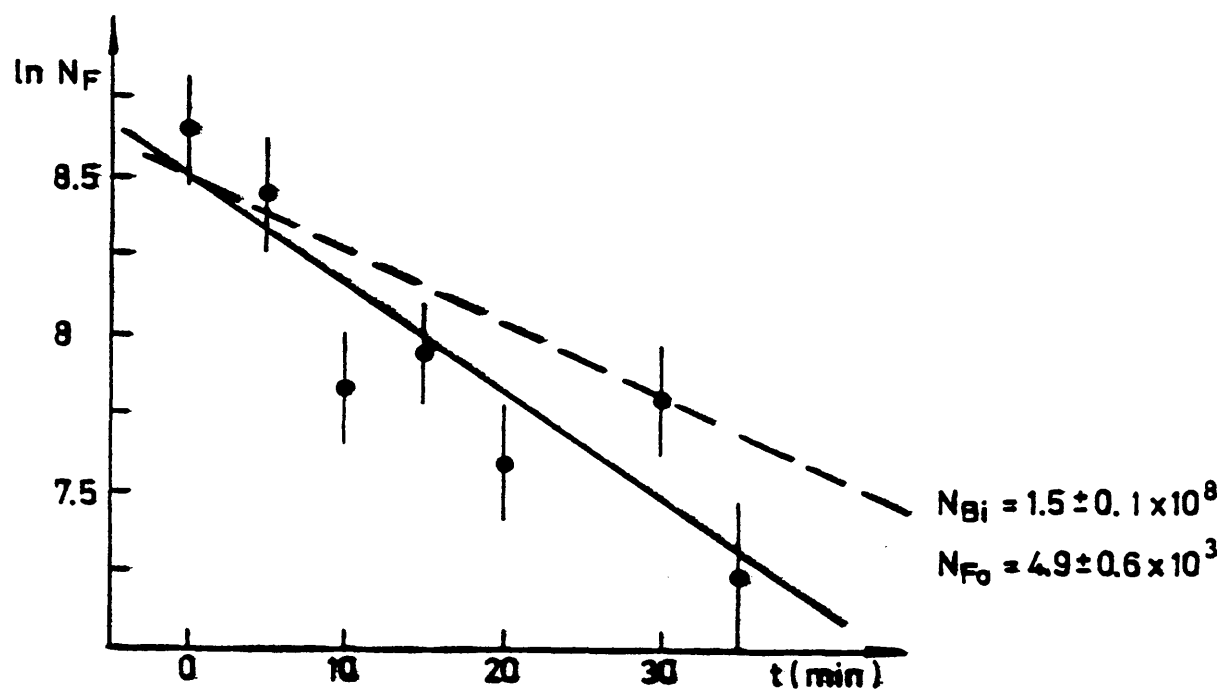
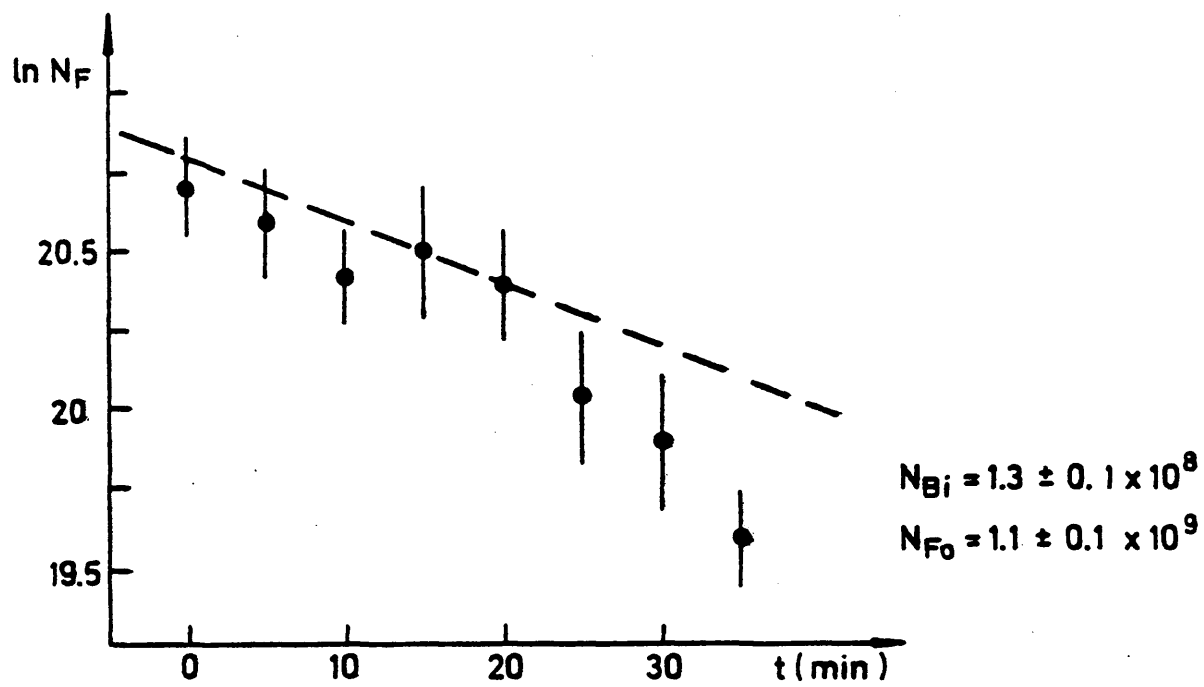


FIG. IV-18

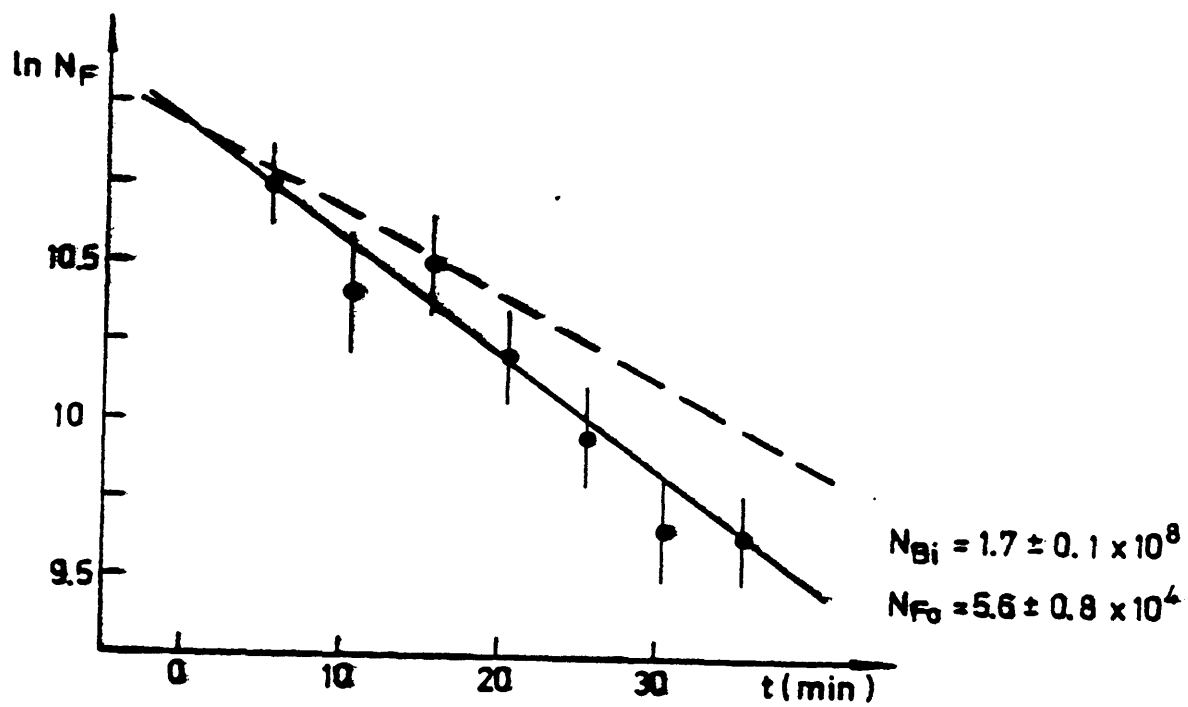
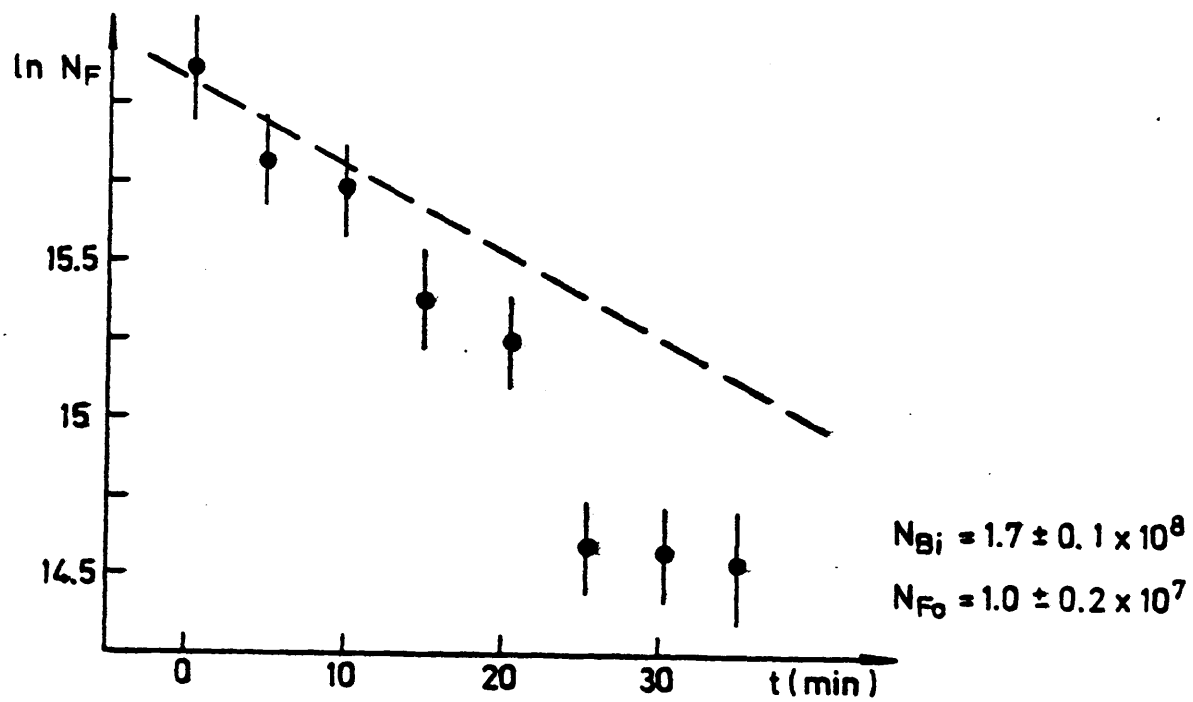


FIG. IV-28

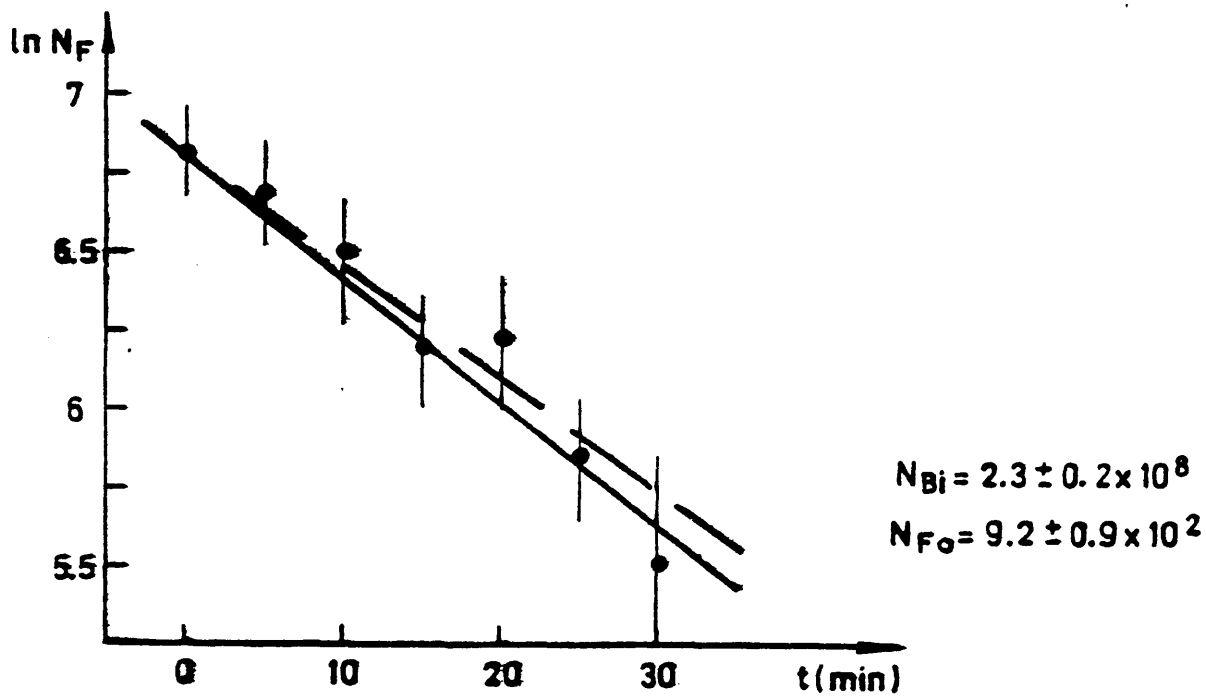
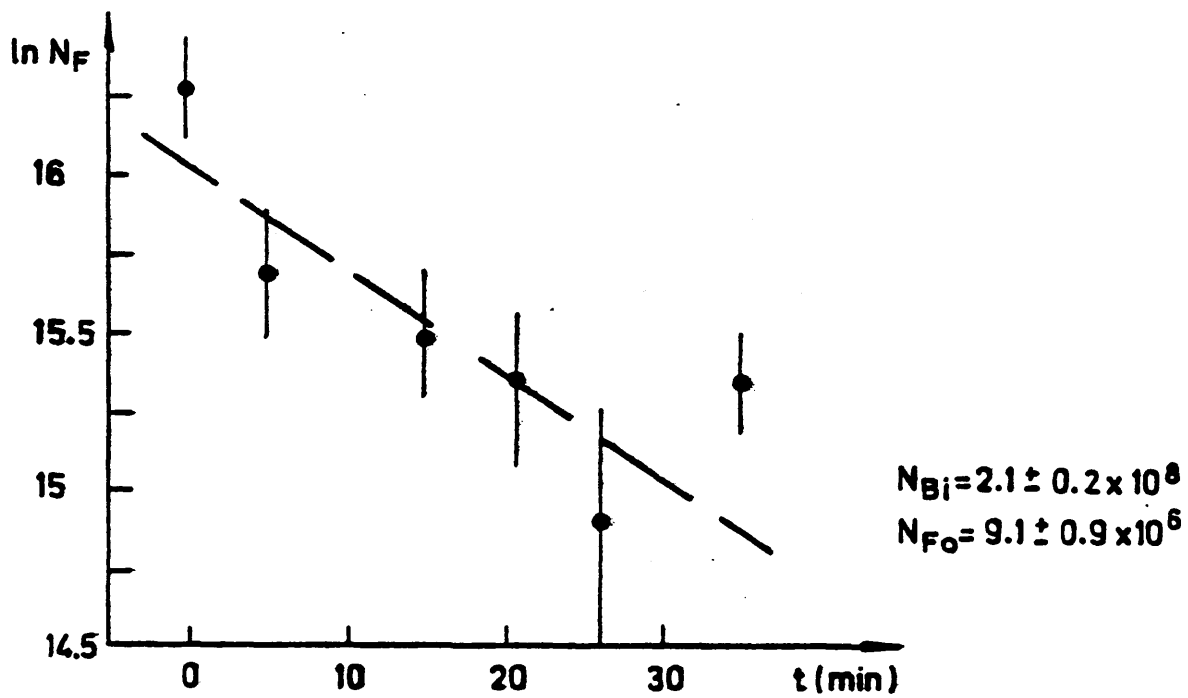
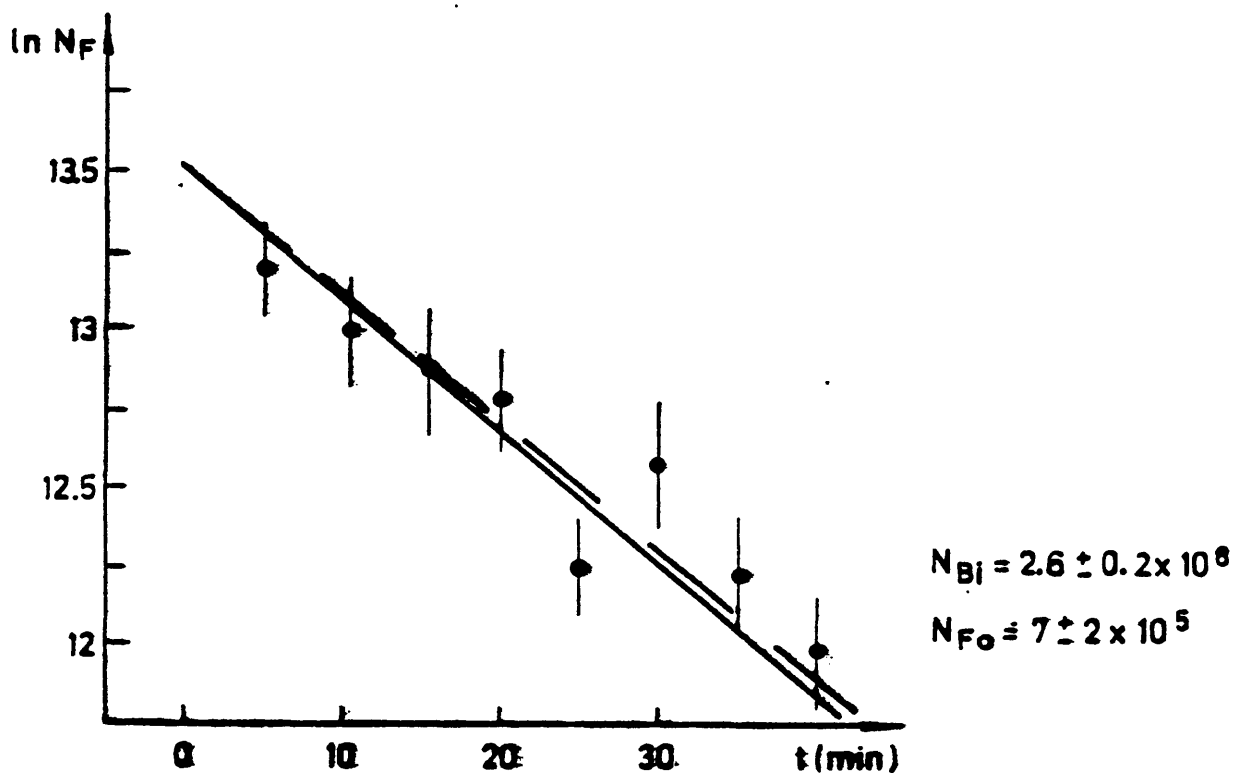
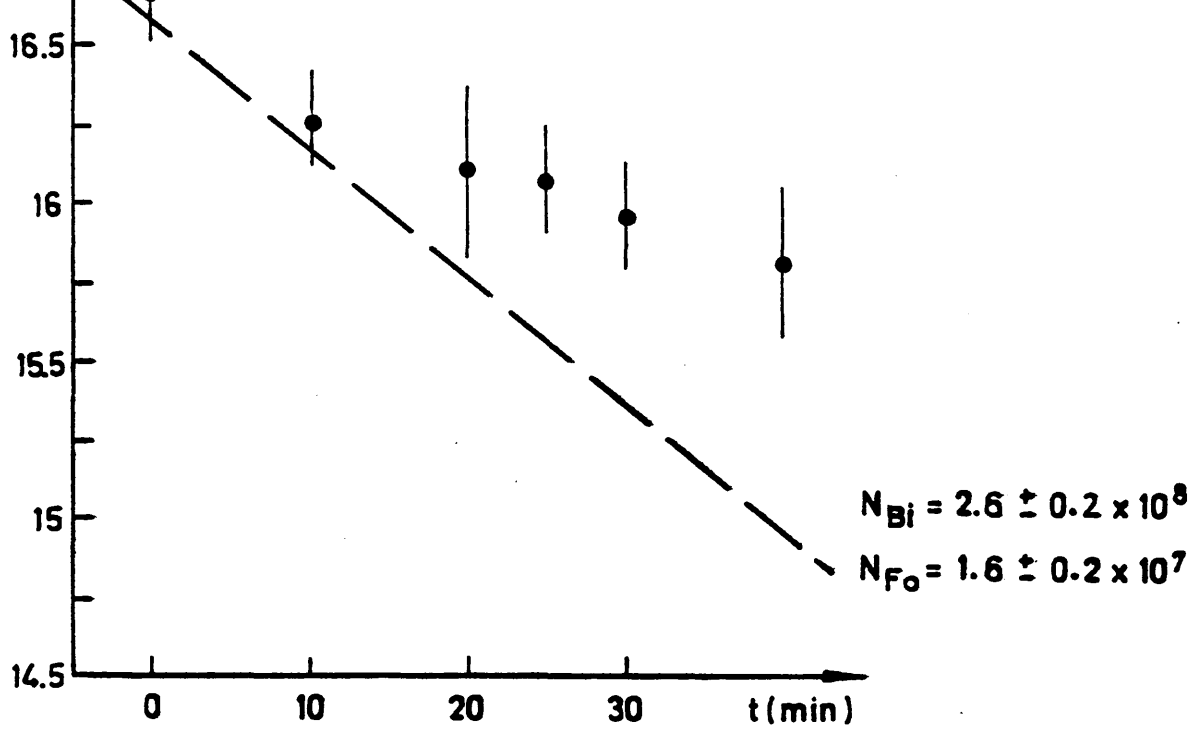
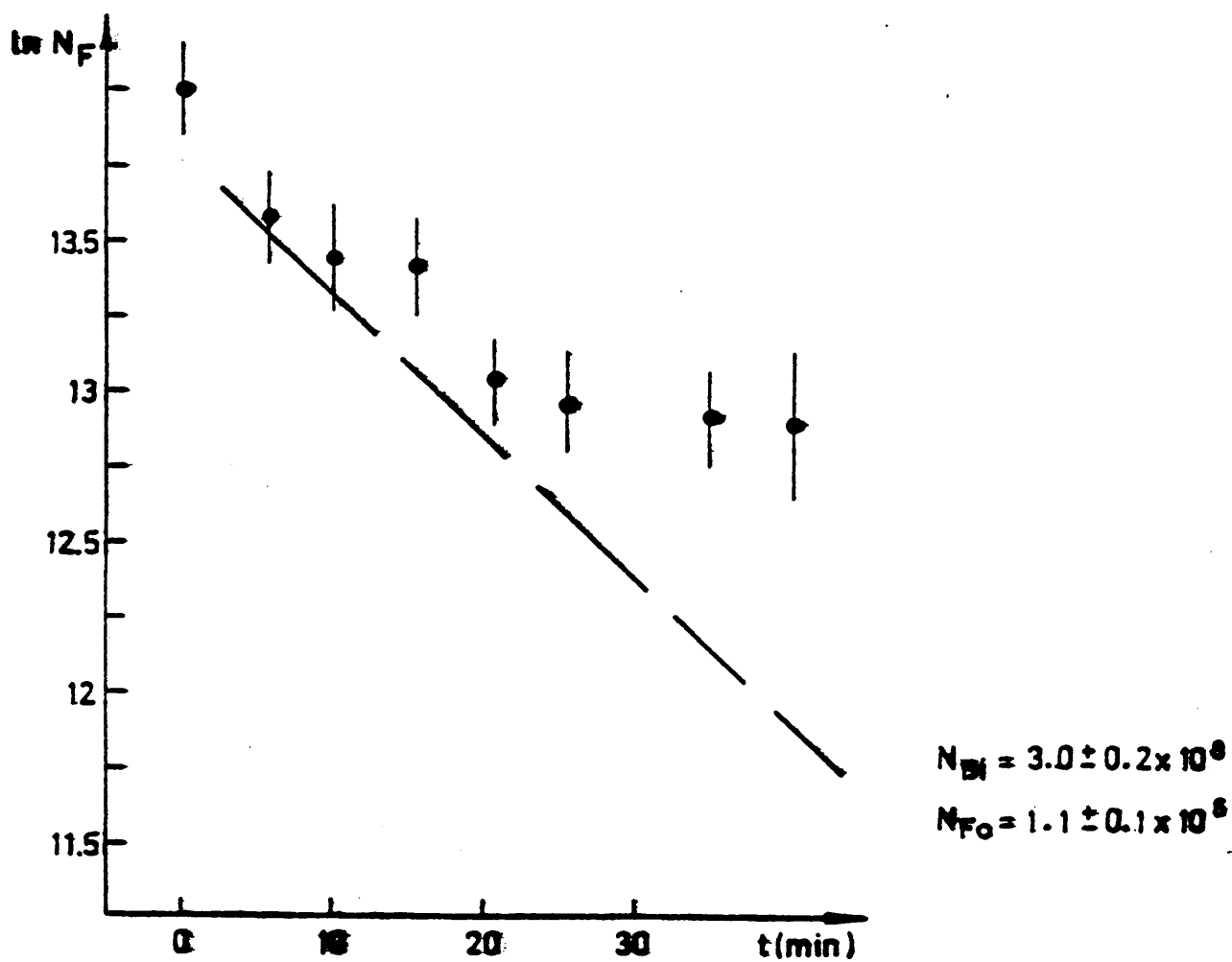
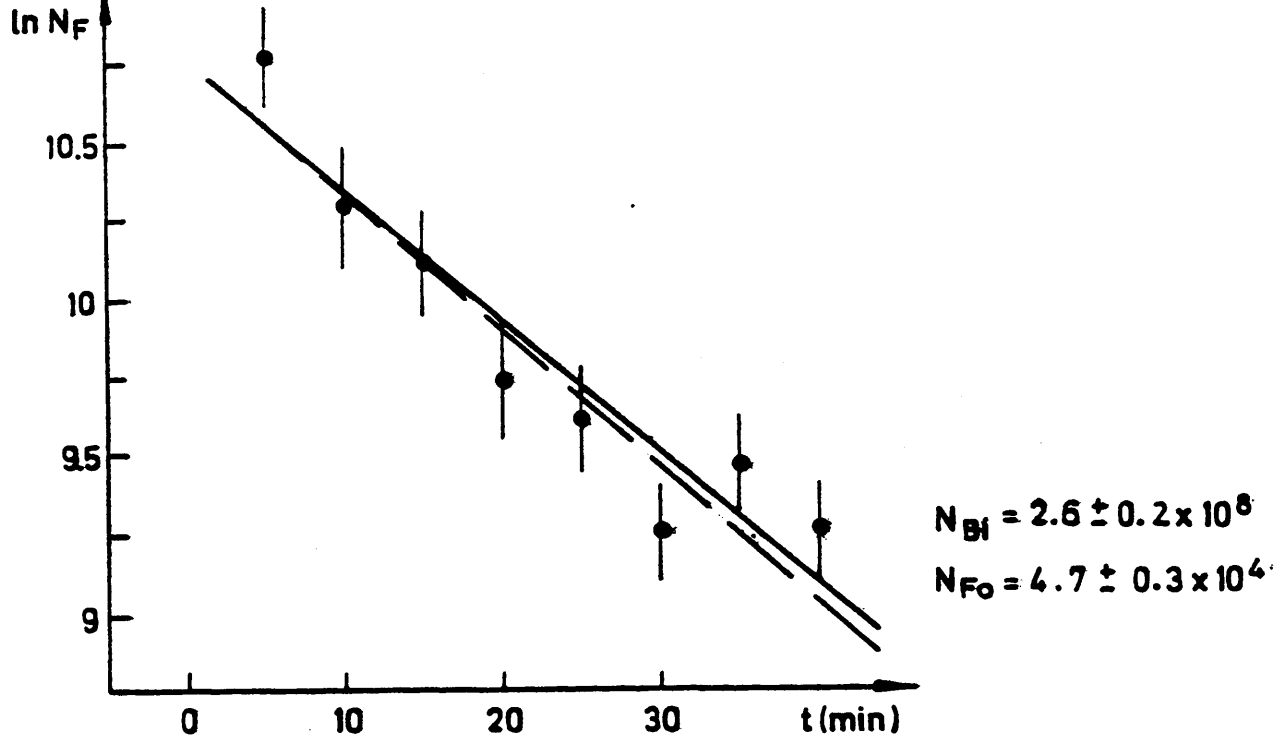


FIG. IV-21







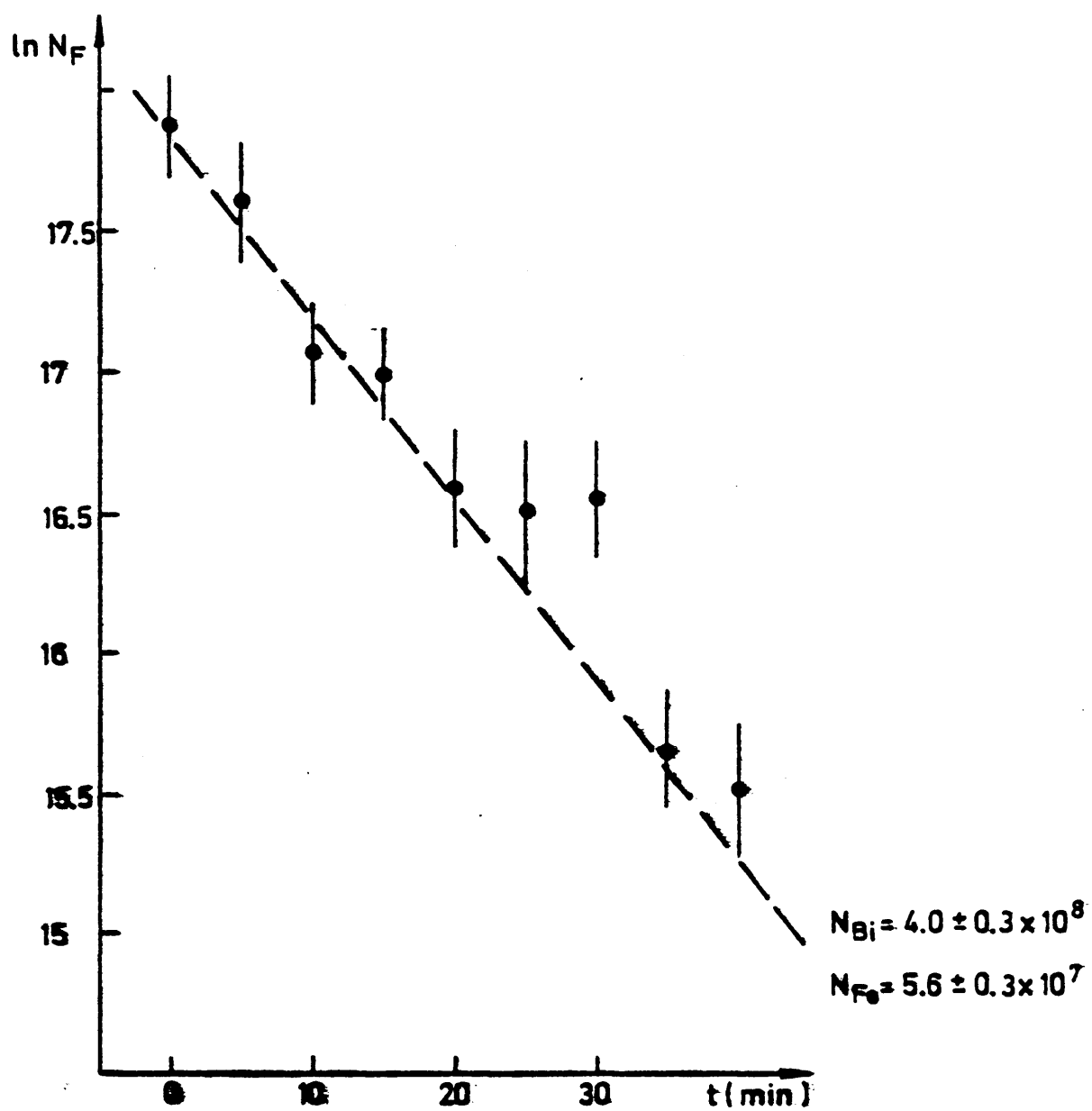


FIG. IV-24

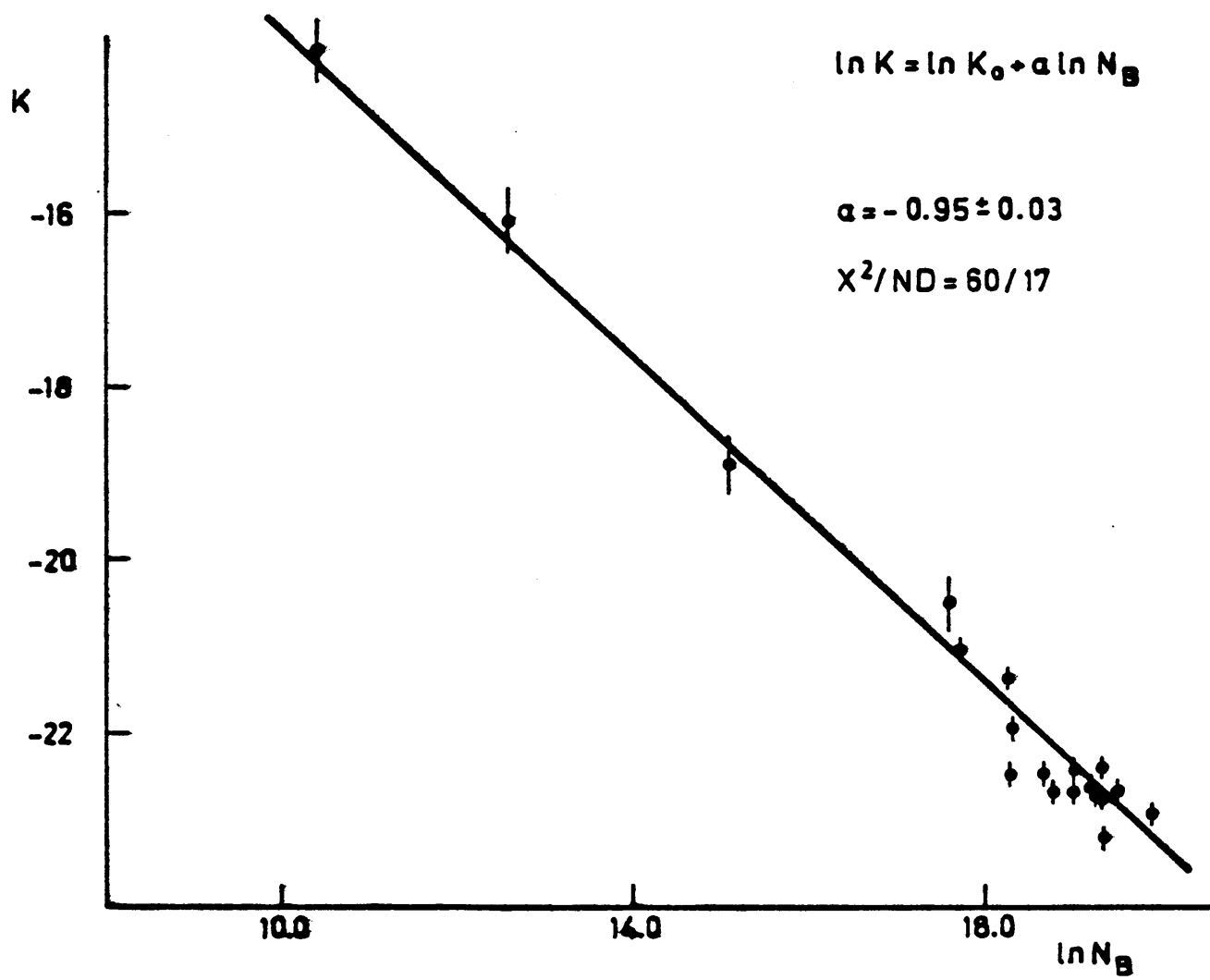


FIG IV - 25

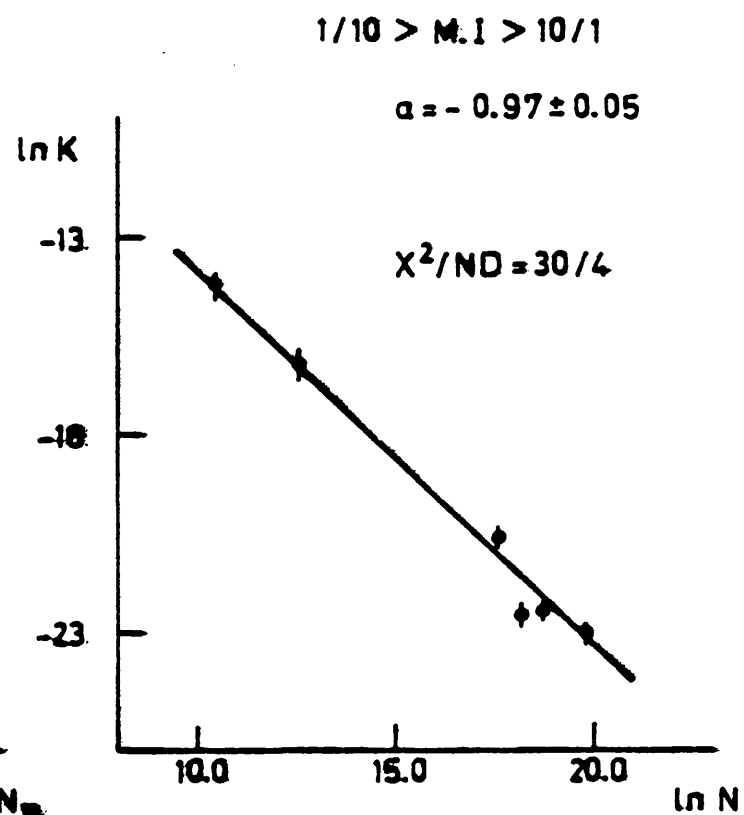
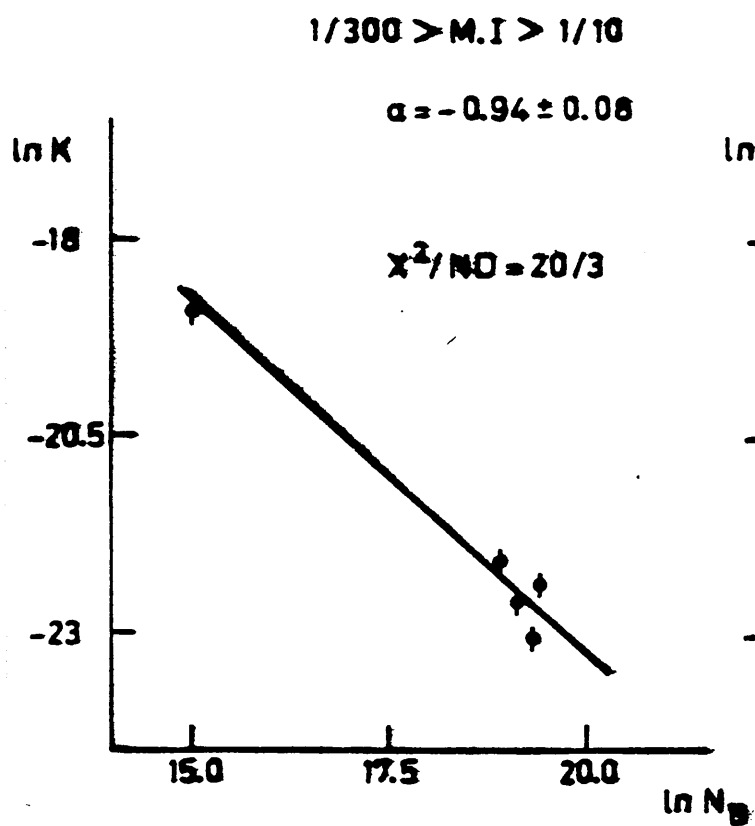
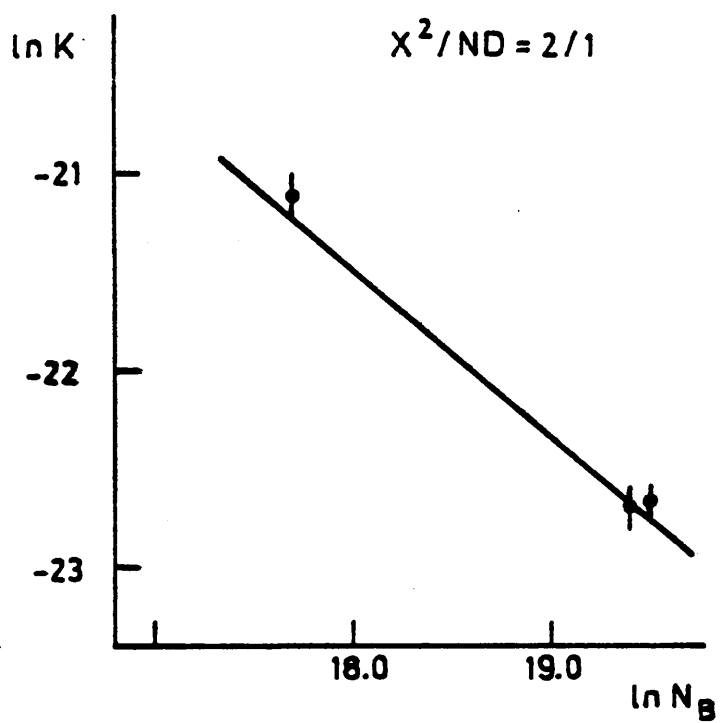
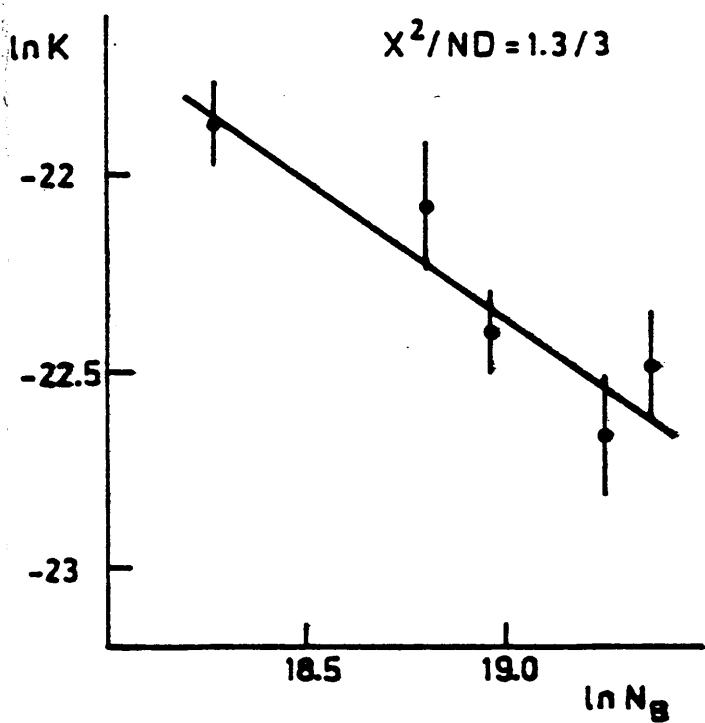


FIG. IV-25

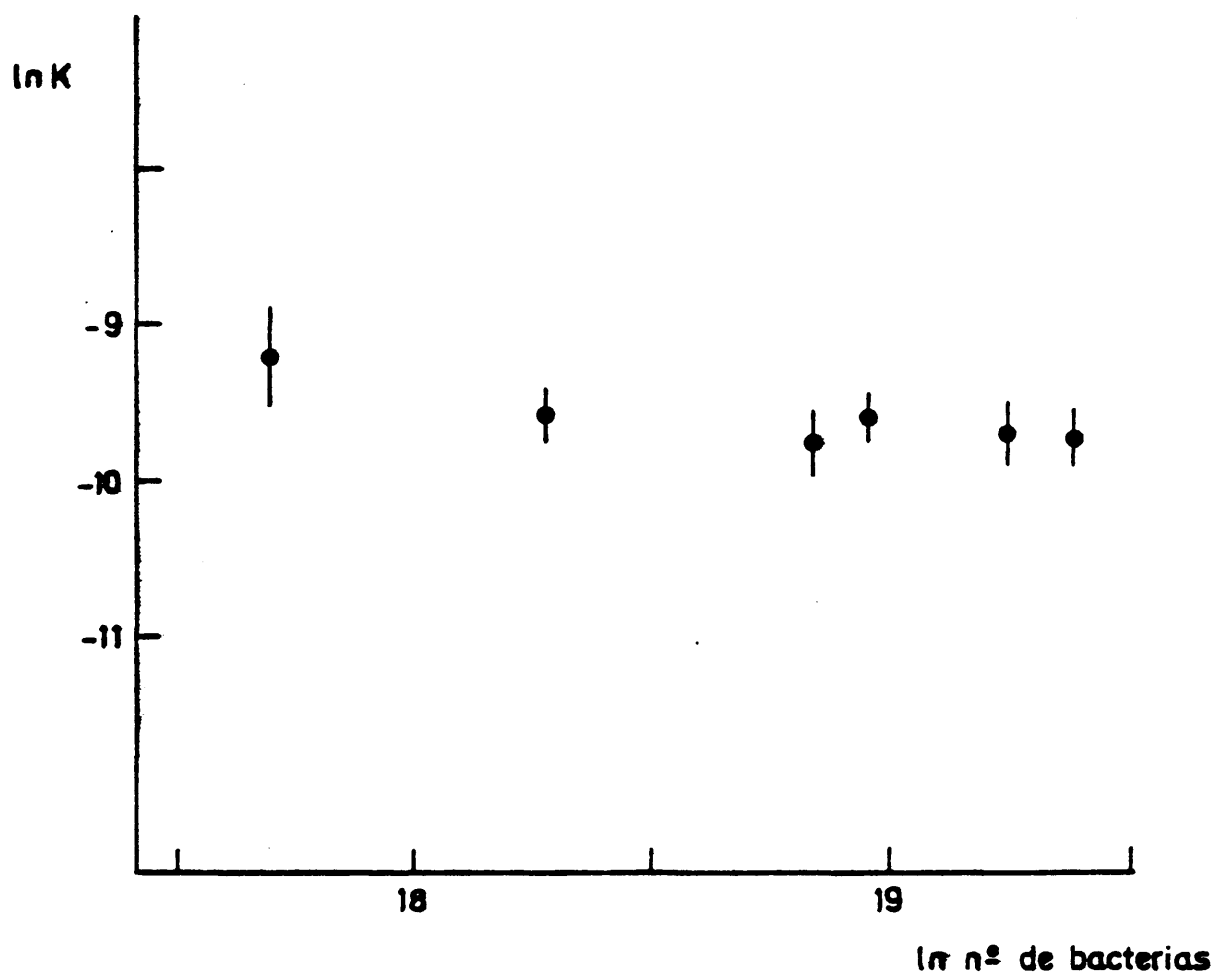
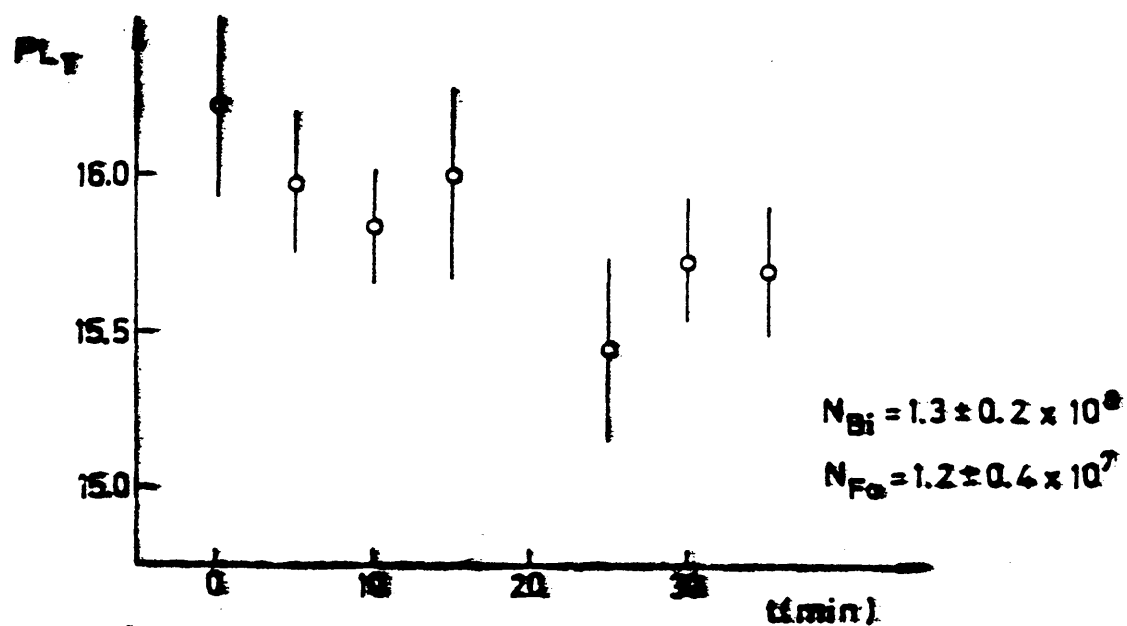
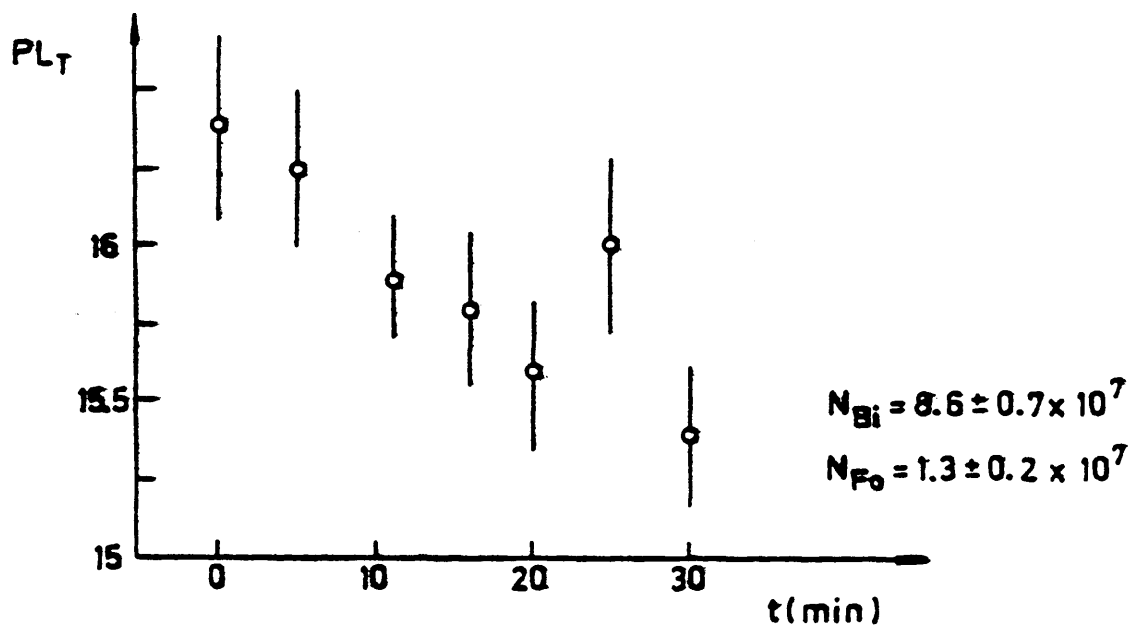
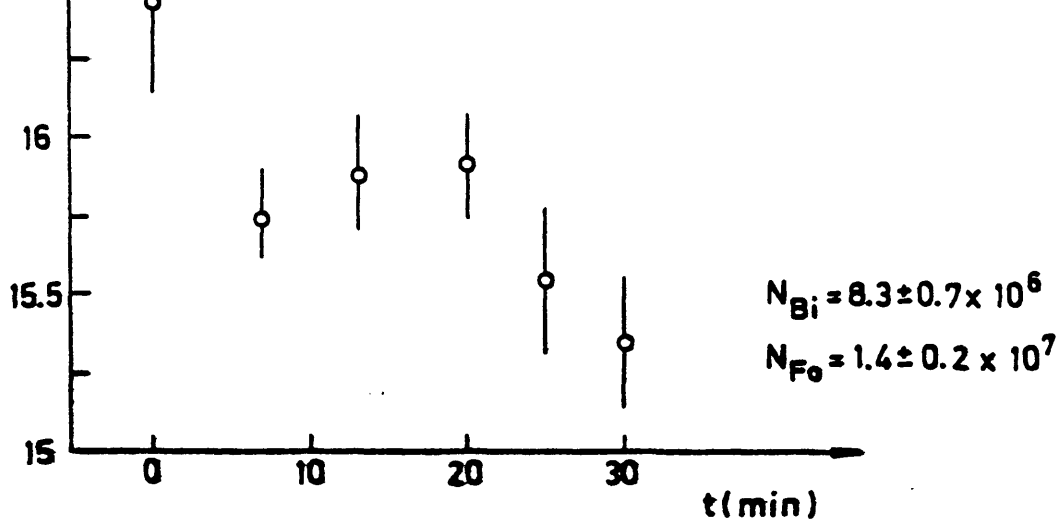
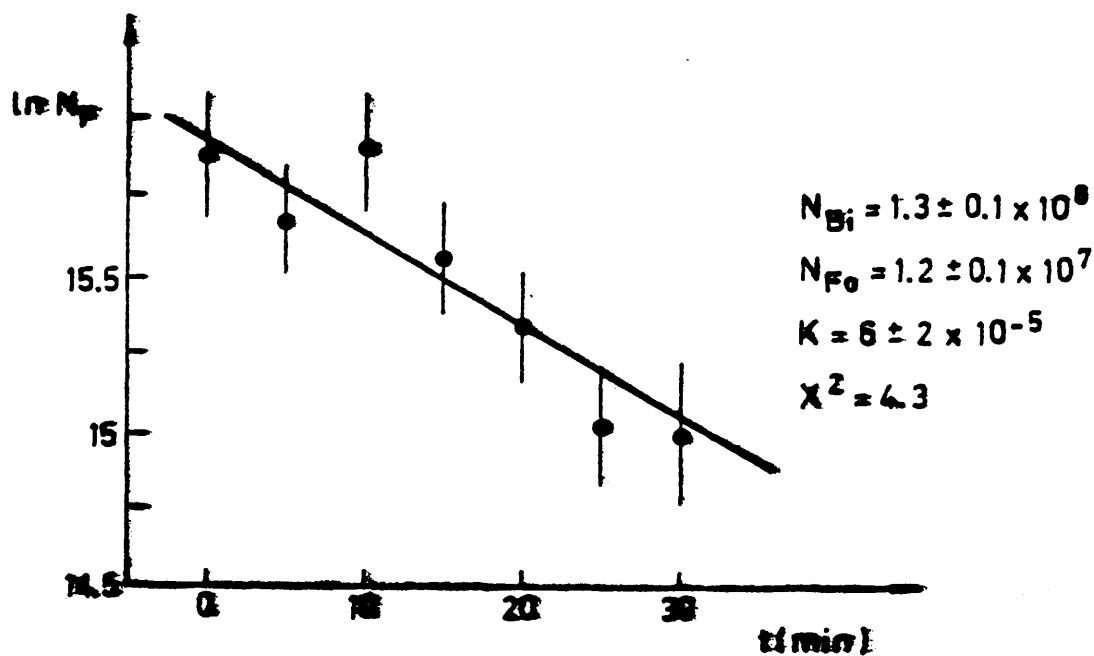
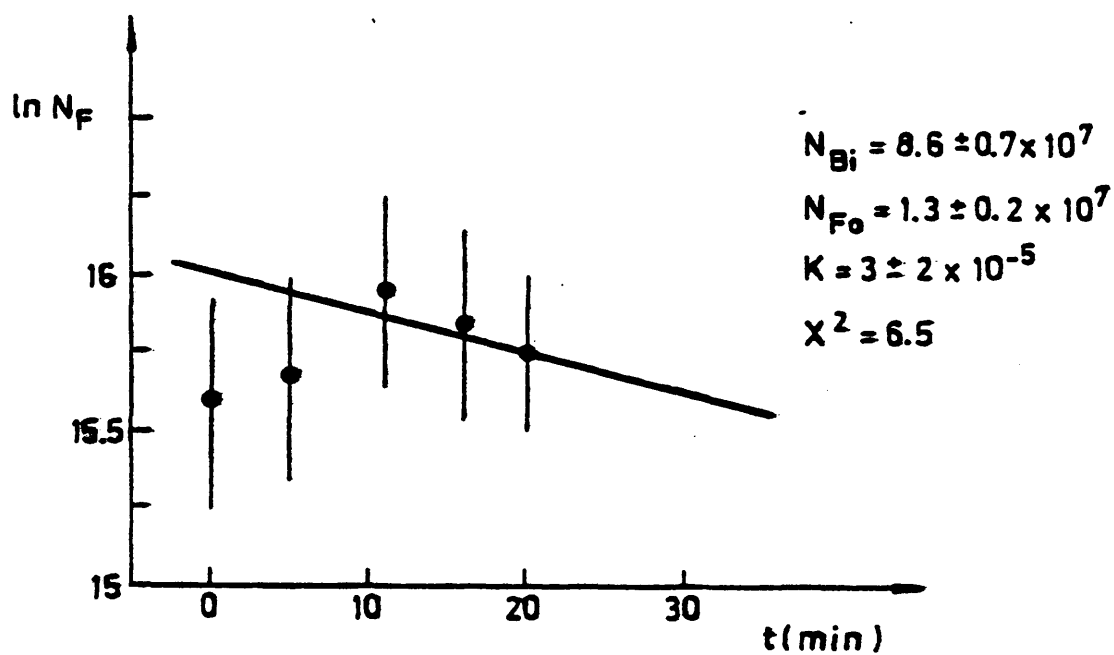
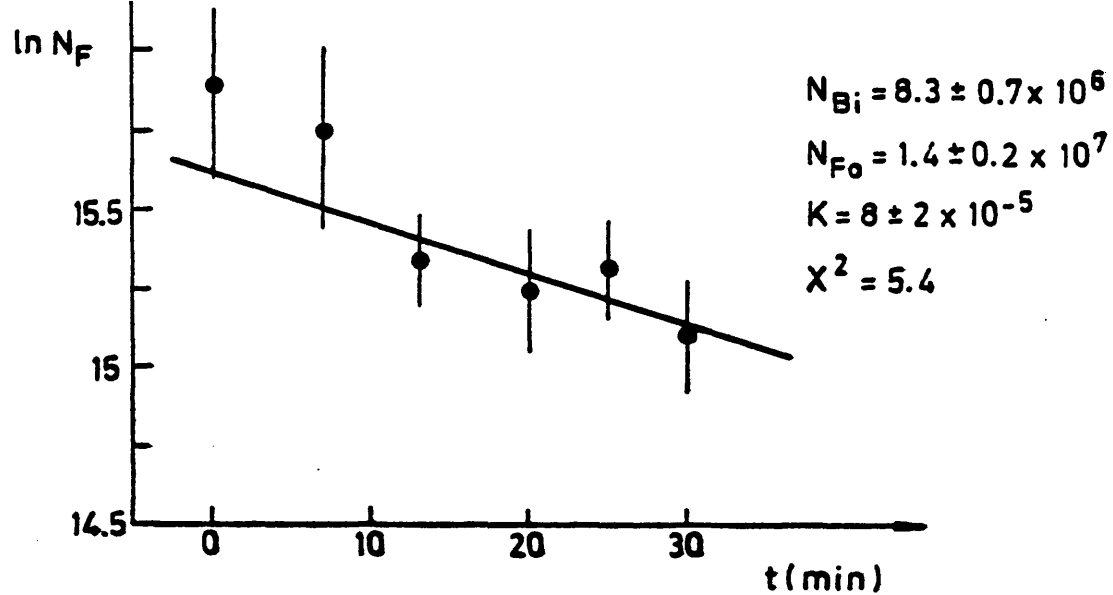
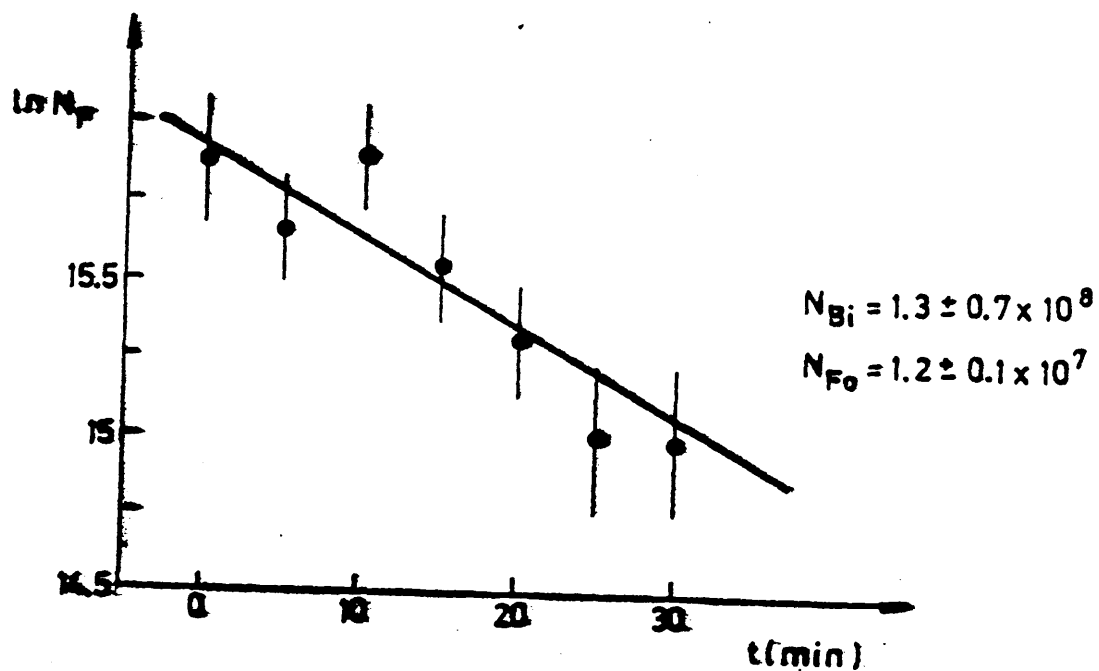
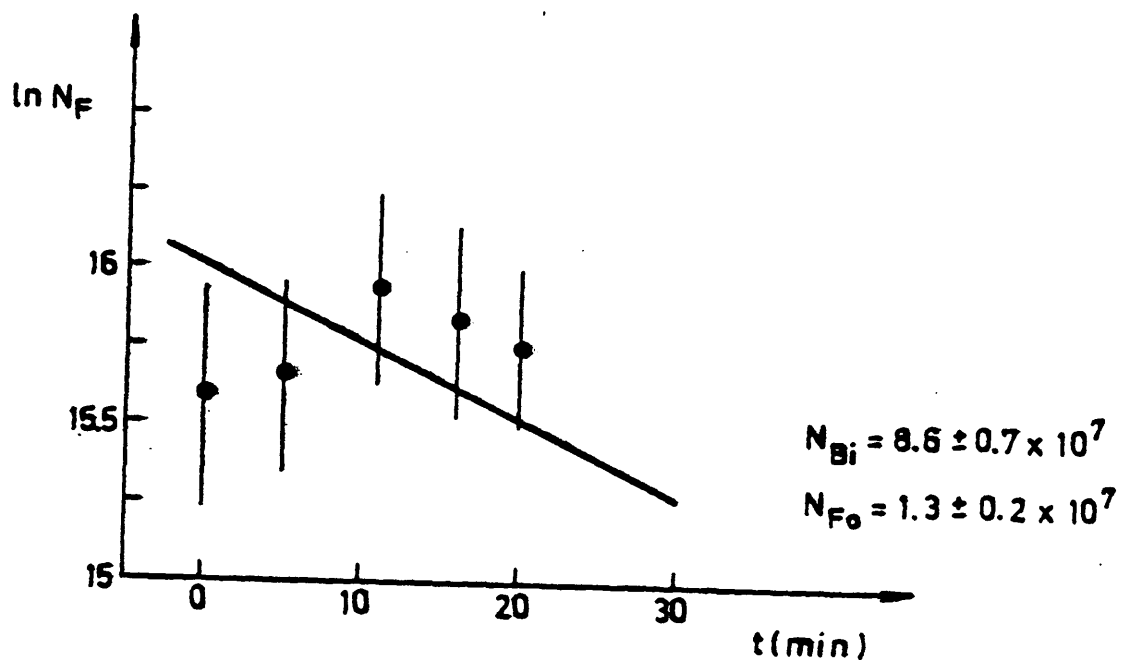
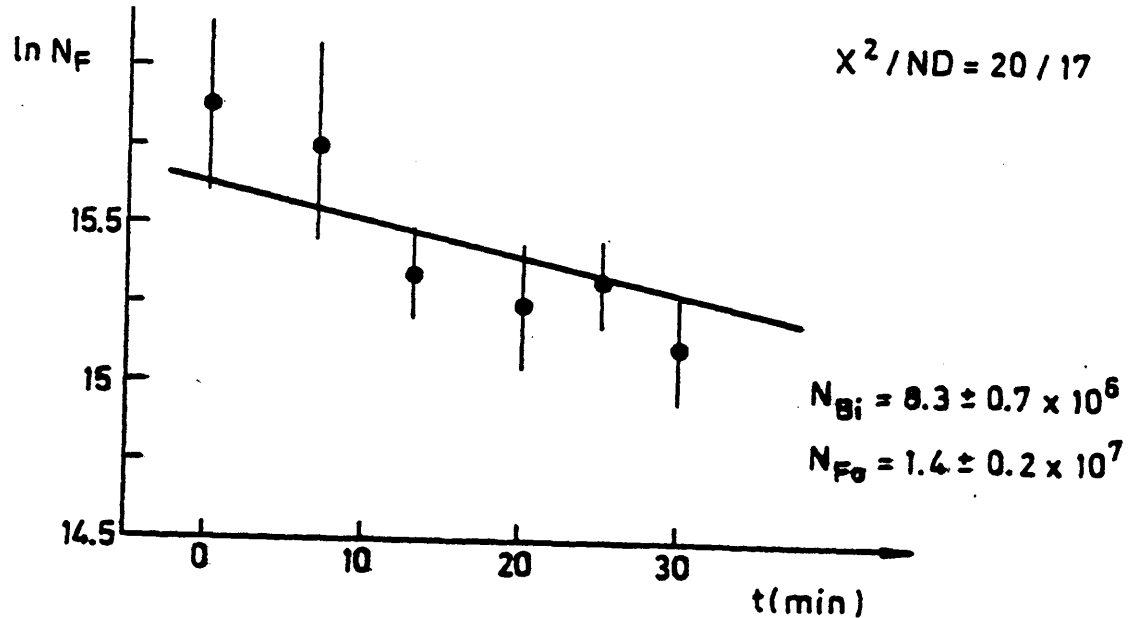


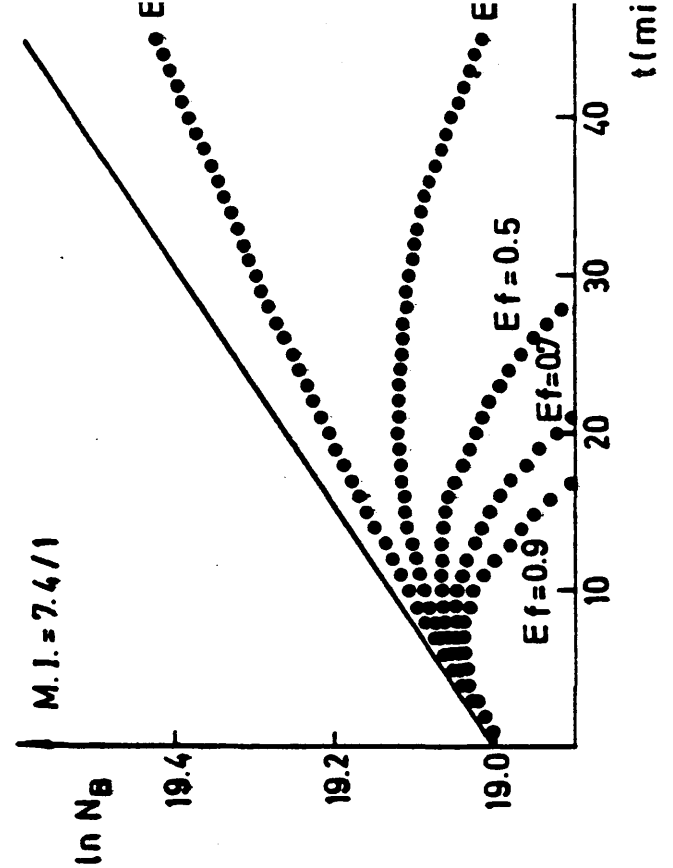
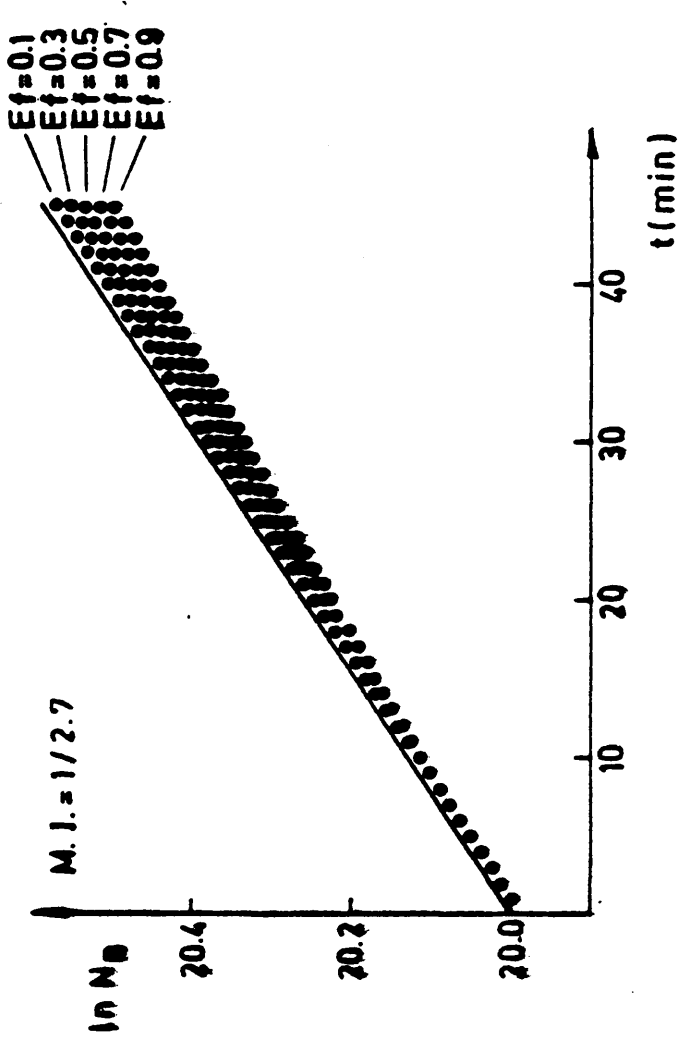
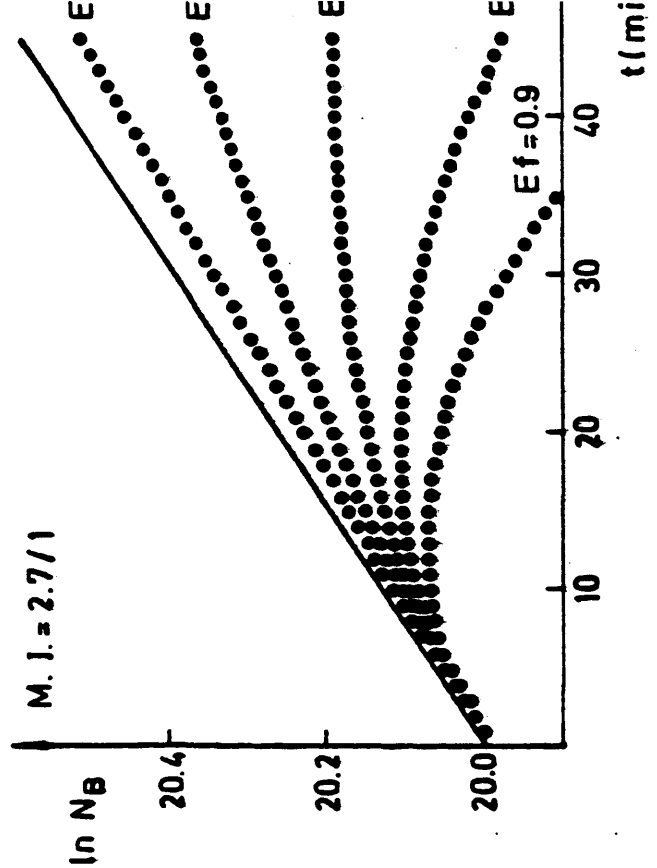
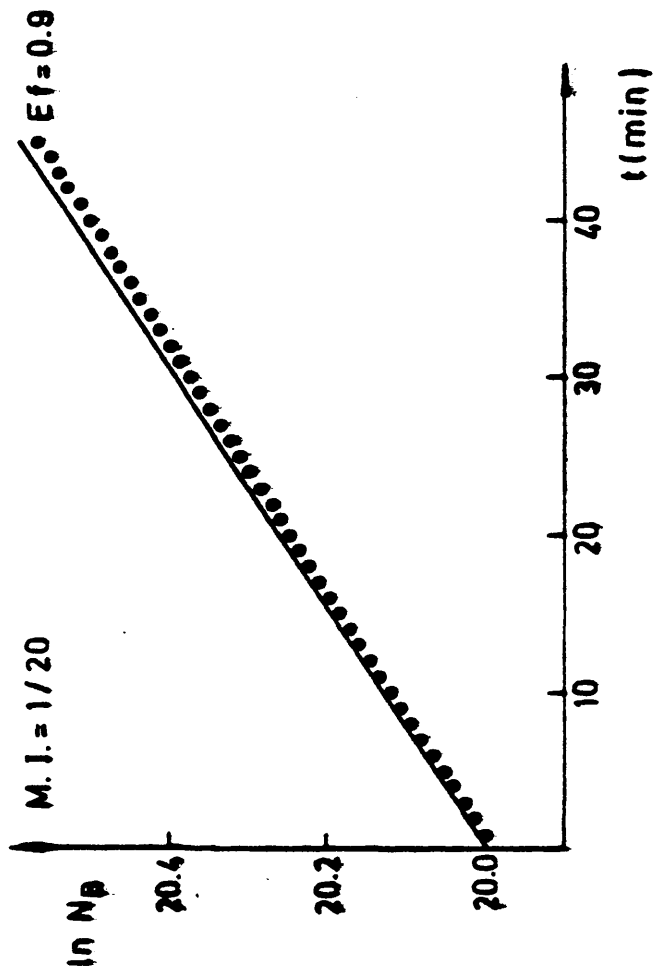
FIG. IV-27

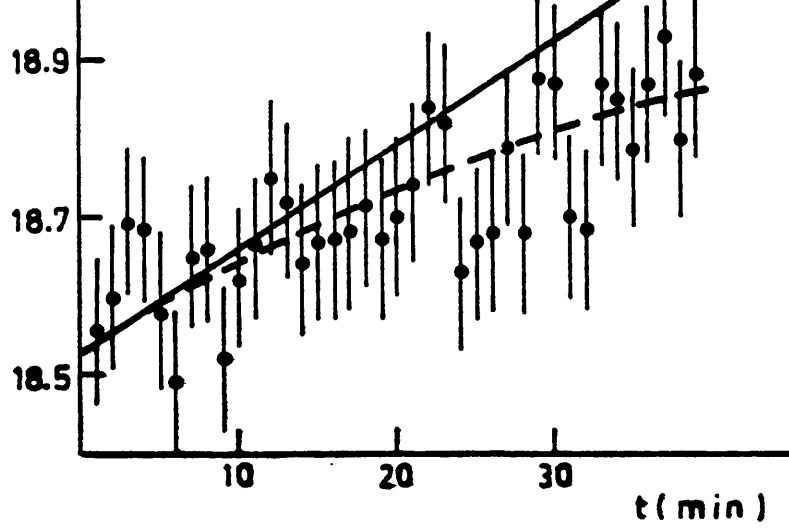






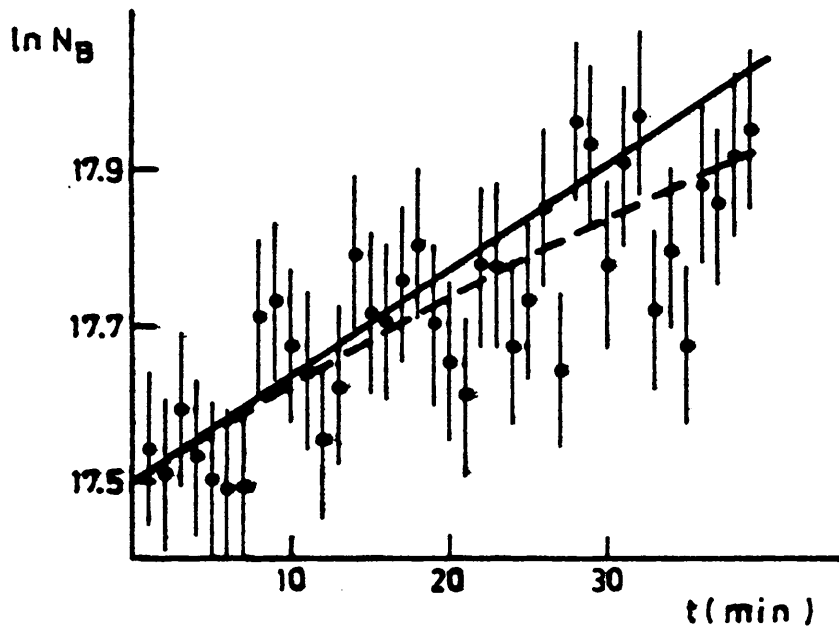






$$Ef_{TEO} = 0.26$$

$$Ef_{AJ} = 0.22 \pm 0.07$$



$$Ef_{TEO} = 0.49$$

$$Ef_{AJ} = 0.4 \pm 0.1$$

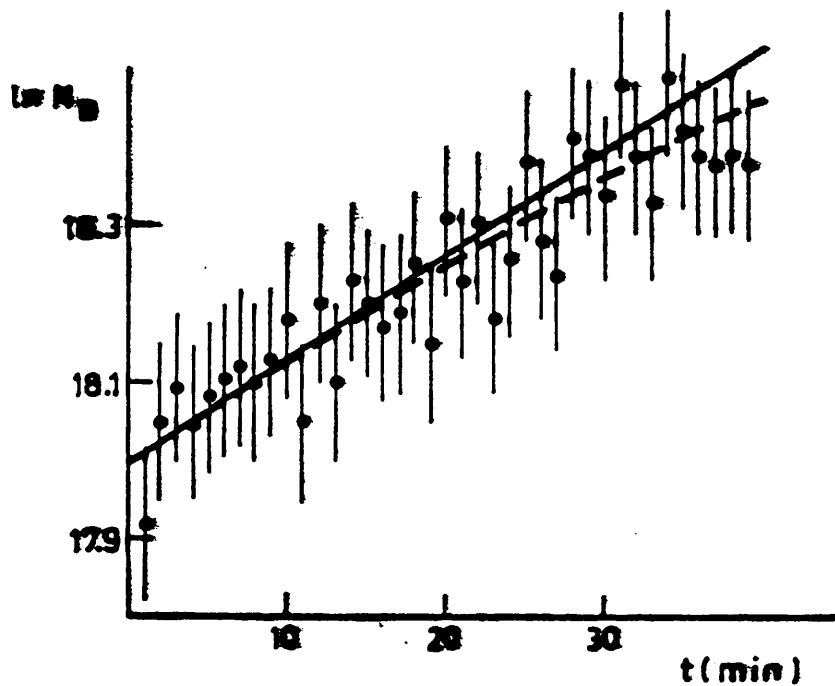
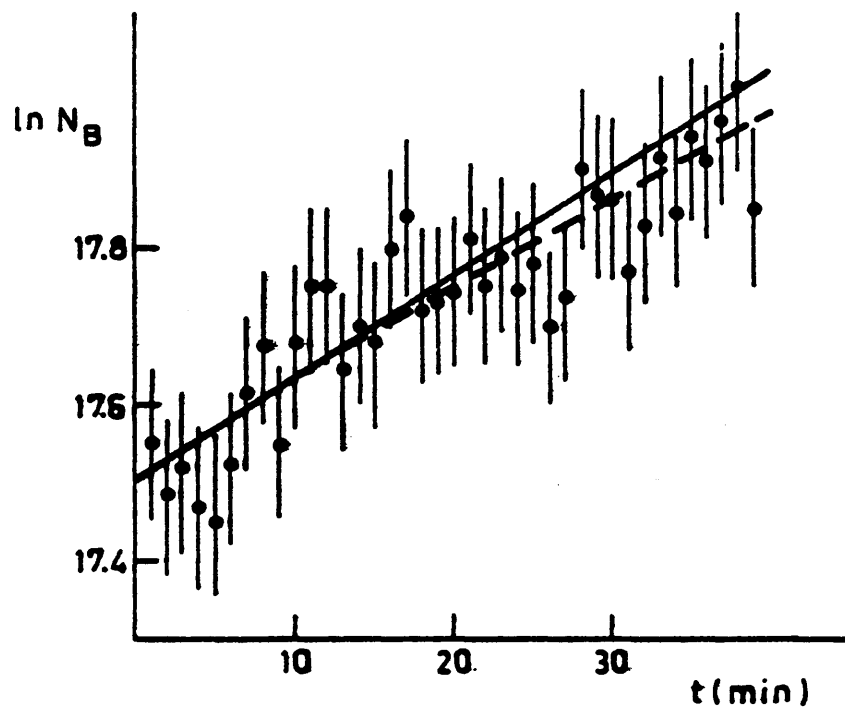


FIG. IV-32

$$Ef_{TEO} = 0.71$$

$$Ef_{AJ} = 0.6 \pm 0.3$$



$$Ef_{TEO} = 0.94$$

$$Ef_{AJ} = 1 \pm 0.5$$

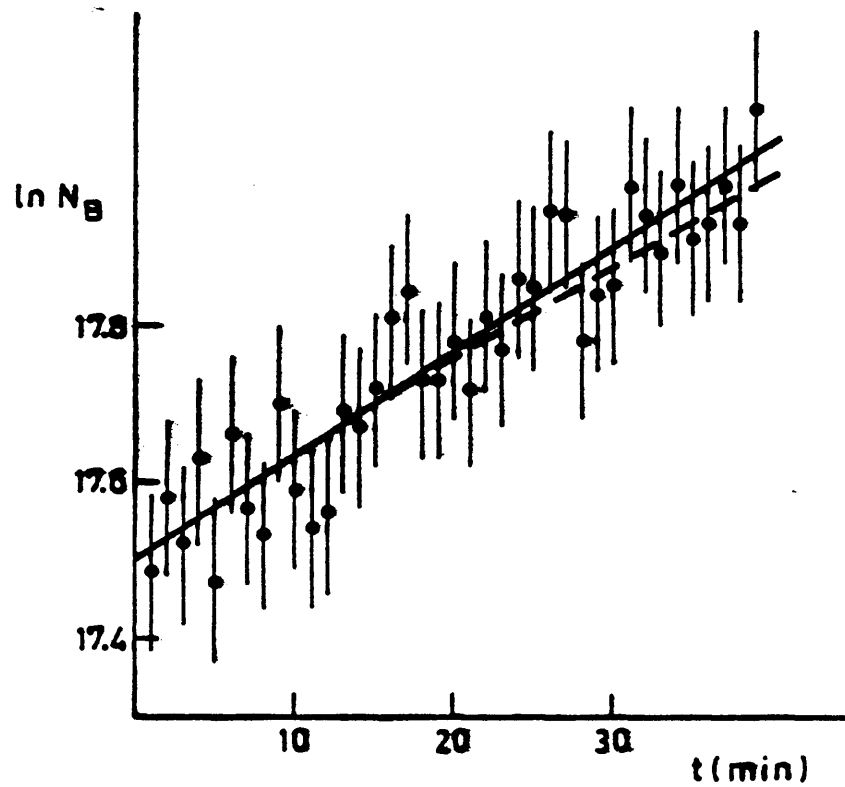


FIG. IV-33

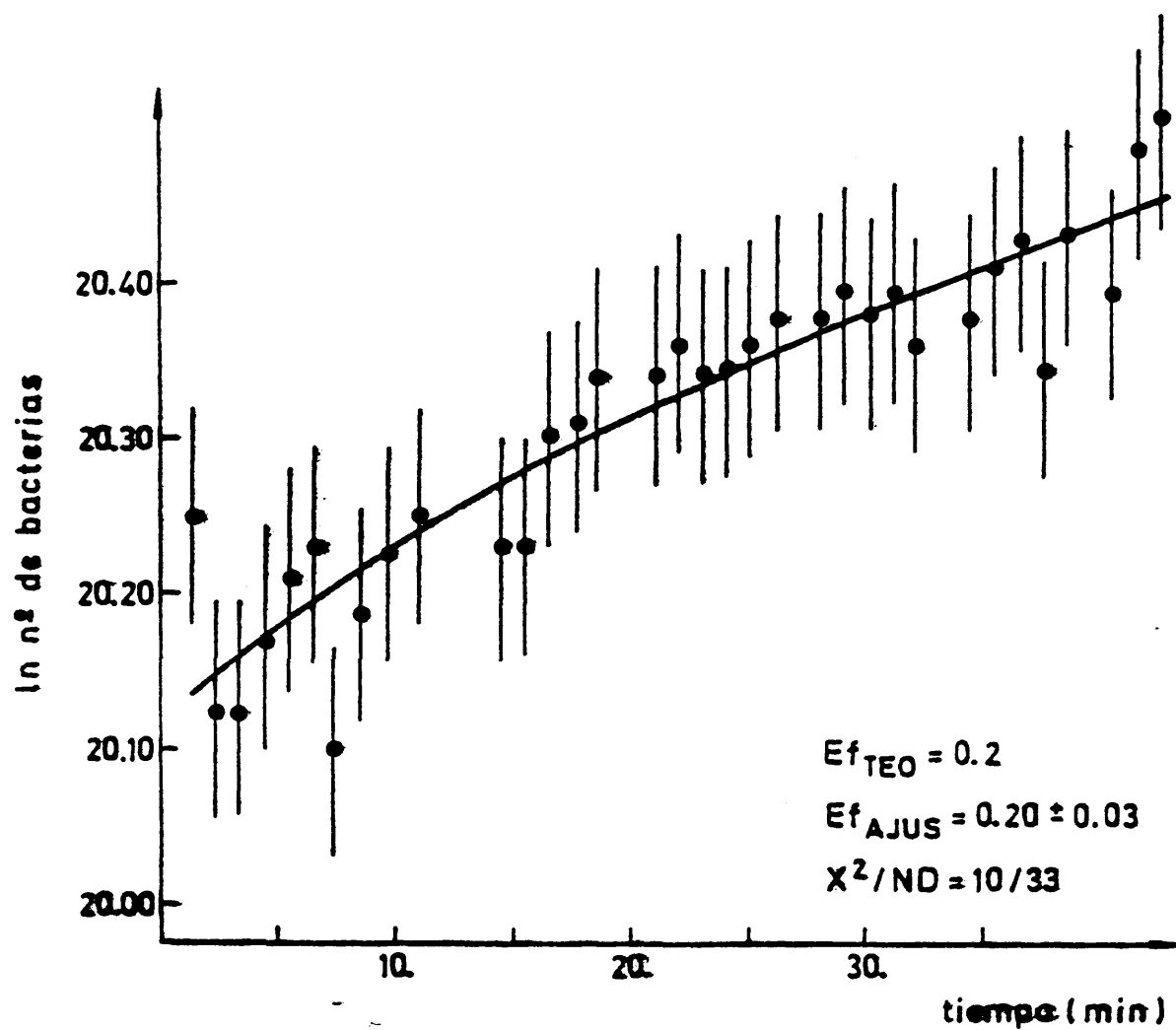
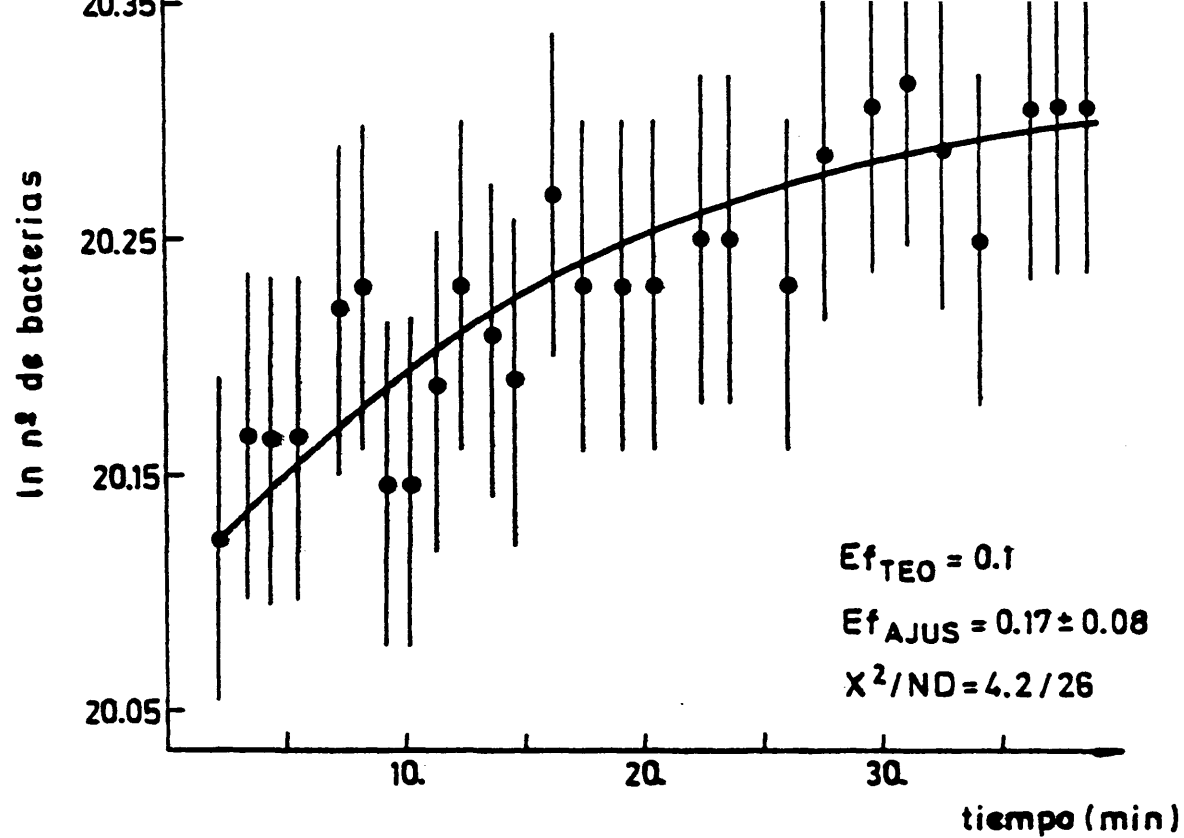


FIG. IV-34

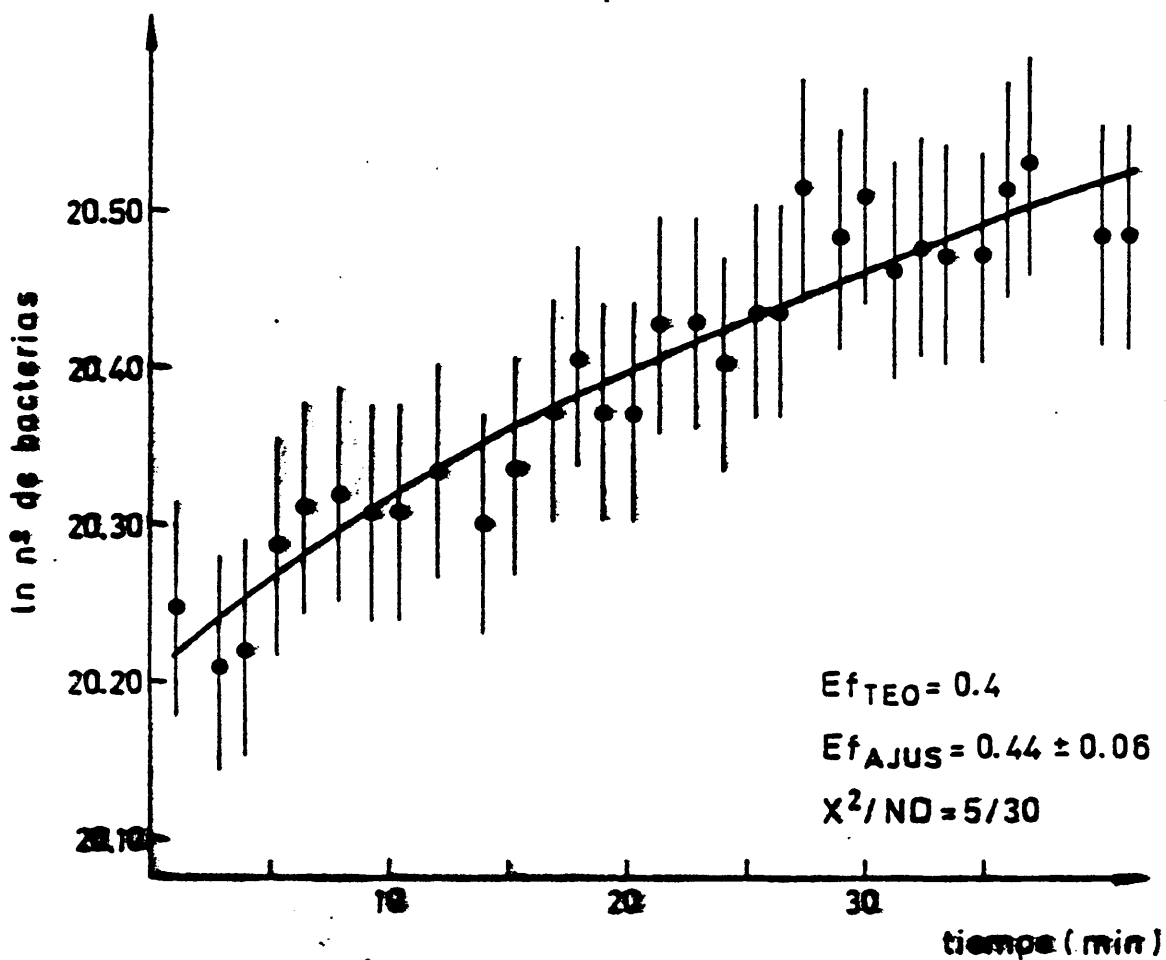
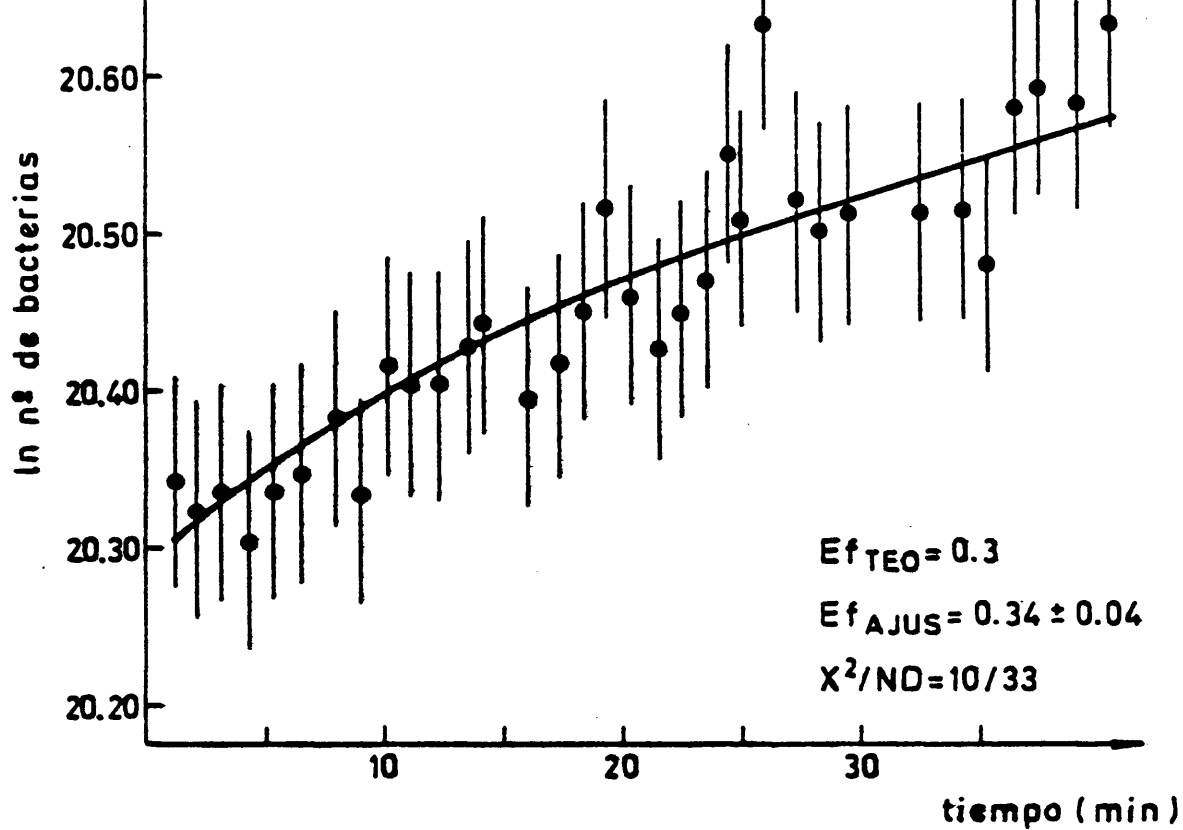


FIG IV-35

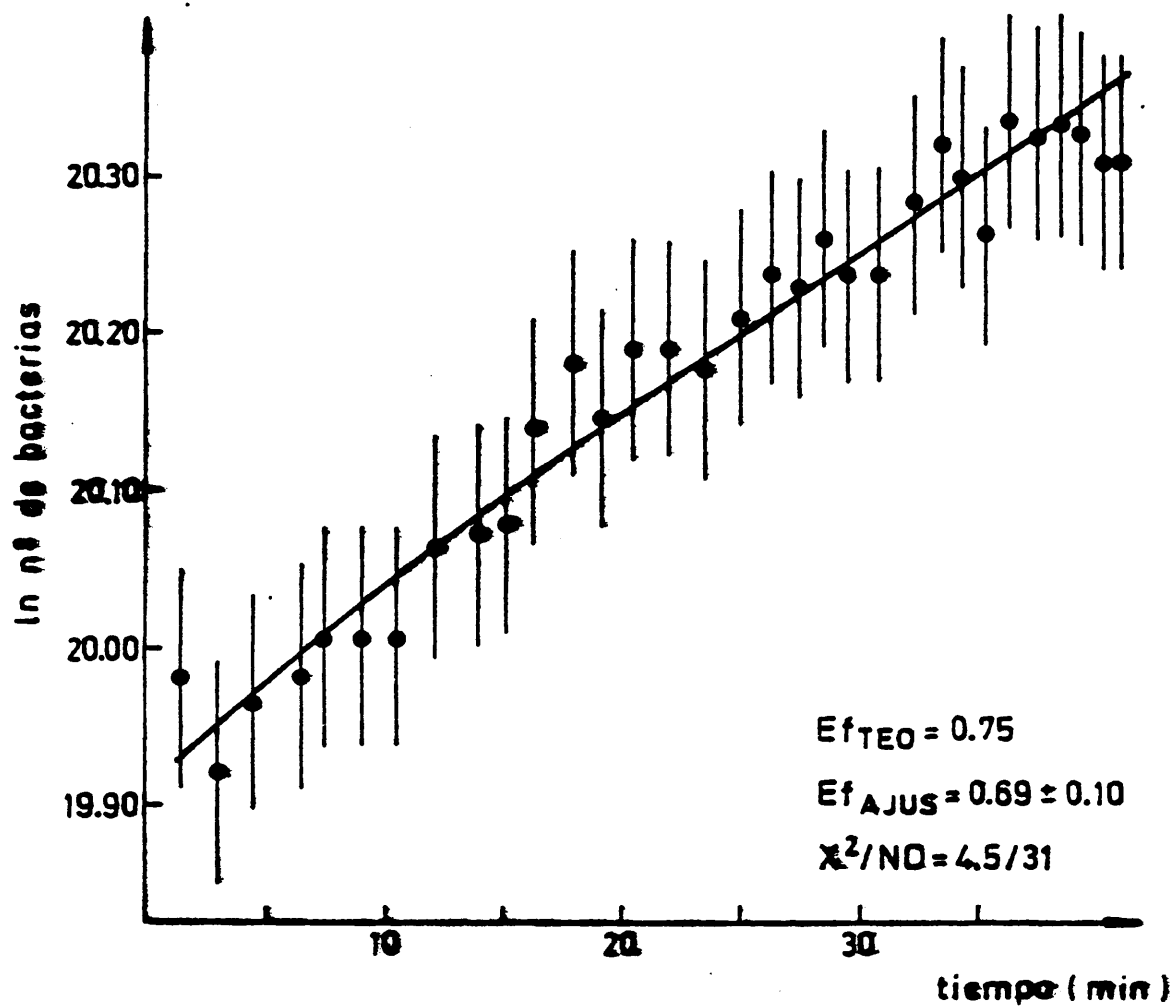
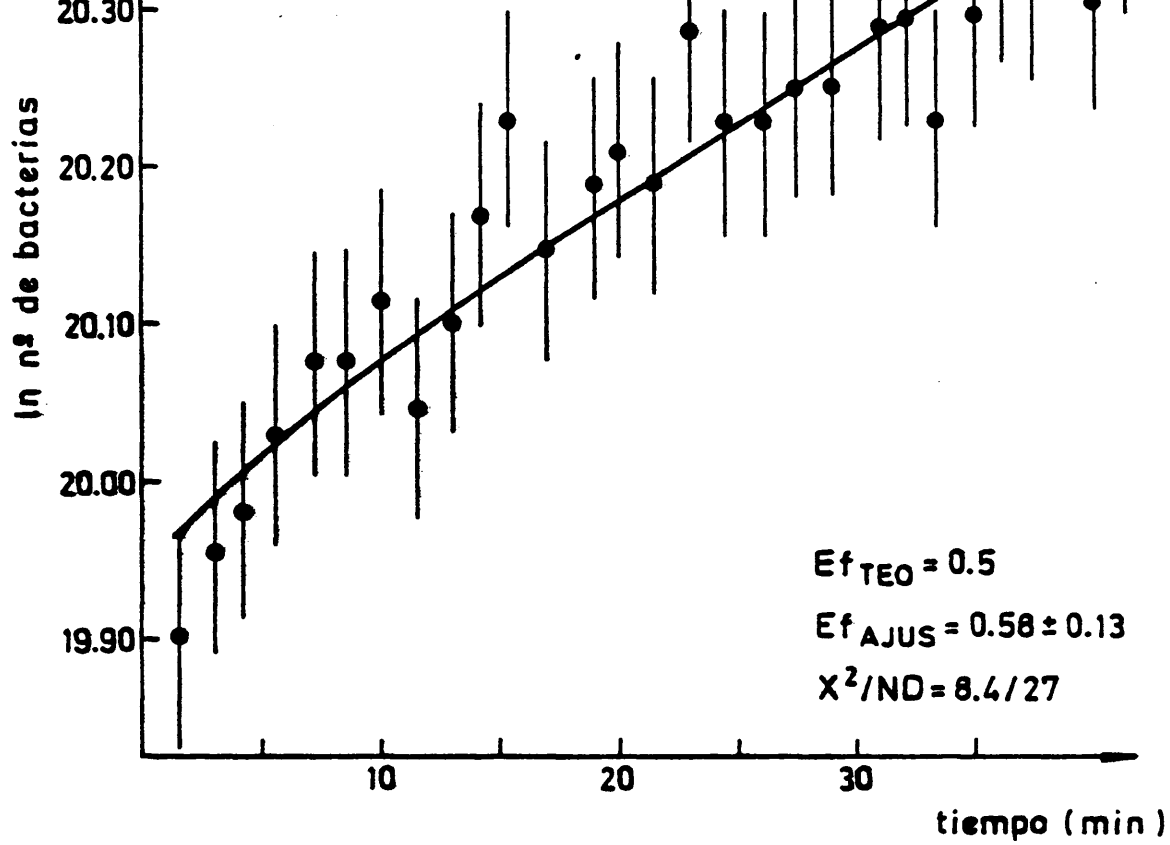


FIG. IV-38

## V.1 Introducción

El presente capítulo está dedicado, en su primera parte, a la presentación de los resultados obtenidos en la interpretación de la cinemática - del proceso de lisis de la bacteria *E. coli* C<sub>600</sub> por el fago  $\lambda_{cI}$  utilizando el modelo propuesto en el capítulo III. En la segunda parte del capítulo discutimos la validez de los resultados, así como las ventajas e inconvenientes que a nuestro modo de ver supone la utilización del modelo descrito en la interpretación de los procesos de lisis de características similares al estudiado.

Una parte de los resultados obtenidos en este trabajo, concretamente los correspondientes a la comprobación experimental de las hipótesis fundamentales en las que se sustentan los cálculos numéricos, así como la parametrización de la curva de crecimiento bacteriano, se presentaron ya en el capítulo IV. La razón para ello es que su validez ha condicionado toda la parametrización propuesta para el modelo. Este capítulo, sin embargo, está dedicado fundamentalmente al análisis y comprobación de los resultados, - que en forma de predicciones, se han obtenido con el modelo. Del estudio - de ambos puede concluirse sobre la descripción numérica global del proceso de lisis bacteriana por fagos.

## V.2 Presentación y discusión de resultados

### V.2.1 Datos experimentales.

Los resultados que presentaremos en secciones posteriores han sido obtenidos utilizando como soporte experimental las medidas de densidad óptica en función del tiempo, realizadas en cultivos bacterianos infectados en distintos momentos de su evolución y con multiplicidades de infección también diferentes. Concretamente las infecciones se han llevado a cabo en - cuatro momentos distintos del crecimiento bacteriano, para cada uno de los cuales se han considerado nueve multiplicidades de infección. Con ello hemos pretendido disponer de una estadística suficiente para analizar la in-



el proceso de lisis. En la tabla V.1 se muestran las situaciones iniciales concretas, que corresponden a un total de 36 curvas de lisis. - Los momentos elegidos para realizar las infecciones comprenden toda la zona de crecimiento exponencial de los cultivos bacterianos, y continúan también en la zona preestacionaria del crecimiento. Como veremos en las figuras V.1 a V.36 que muestran las curvas de lisis, las multiplicidades de infección elegidas permiten llegar a situaciones en las que el crecimiento bacteriano alcanza prácticamente su límite máximo - en ausencia de fagos. Esta combinación de momentos y multiplicidades - de infección permite obtener situaciones experimentales que van desde aquellas en las que la densidad óptica del cultivo no supera 1.0 u.o/ml hasta aquellas otras en las que se alcanzan valores del orden de los - correspondientes al número de bacterias en la fase estacionaria del - crecimiento. Estas situaciones extremas son equivalentes a aquellas en las que el final de la lisis se consigue pasadas de 6 a 13 horas, aproximadamente, desde la iniciación del cultivo. El número de determinaciones de densidad óptica por curva de lisis varía dependiendo del tiempo en que se alcanza la estabilidad final y las determinaciones se han realizado a intervalos de tiempo que fluctúan entre 15 y 60 minutos, según fueran directas o requiriesen dilución.

Es interesante hacer notar la sistemática seguida en la realización de las medidas ya que puede afectar ligeramente las condiciones experimentales en que éstas se han realizado. Concretamente, la evolución de las densidades ópticas ha sido seguida a razón de 3 ó 4 curvas de lisis por día, y de forma que todas las realizadas en el mismo día corresponden a cultivos infectados en el mismo momento del crecimiento. En consecuencia tales curvas proceden del mismo inóculo y podría ocurrir que hubiese una mayor compatibilidad entre ellas dada la similitud de las condiciones experimentales de que provienen. Ello implica que las series - de curvas correspondientes al mismo tiempo de infección se han llevado a cabo, al menos, en tres días distintos de experimentación, y que las correspondientes a la misma relación inicial fagos-bacteria se han realizado, necesariamente, en días diferentes. Aunque hemos procurado que las condiciones experimentales fuesen lo más semejantes posible, podría

de interpretación de los datos que en nada tienen que ver con la bondad del modelo numérico propuesto.

Los valores de densidad óptica en función del tiempo, correspondientes a cada curva de lisis, se muestran en las figuras V.1 a V.36 - en las que la ordenada muestra el logaritmo neperiano del número de bacterias. La transformación de la densidad óptica en número de bacterias se ha realizado a partir de la relación previamente establecida - entre ambas, según la expresión IV.2.2. Es conveniente insistir en que no se ha olvidado la posibilidad de que para tiempos posteriores a la infección parte de la absorción de luz sea debida a restos celulares - procedentes de las lisis bacterianas. Concretamente en el capítulo III se expuso la forma en que dicha posibilidad se ha tenido en cuenta para los cálculos numéricos realizados por el modelo. Es por ello que en las figuras en las que se presentan curvas de lisis aparece en el eje de ordenadas, junto al  $\ln$  del número de bacterias, un asterisco, que indica que además de la evolución del crecimiento bacteriano se está representando la posible contribución de los restos celulares a la densidad óptica. Dicha contribución es evidente que sólo puede estimarse en función de los valores que tome el parámetro a través del cual se ha considerado.

#### V.2.2 Tipos de ajustes.

Utilizando la información experimental referida se han realizado - los siguientes tipos de ajustes:

- 1.- Ajustes individuales de cada curva de lisis (36 ajustes). Figuras V.1 a V.36.
- 2.- Ajustes simultáneos por grupos de curvas de lisis correspondientes al mismo momento de infección y distinta multiplicidad (4 ajustes de 9 curvas de lisis cada uno). Figuras V.37 a V.40.
- 3.- Ajustes simultáneos de grupos de curvas de lisis de igual multiplicidad de infección y distinto momento (9 ajustes de 4 curvas cada uno). Figuras V.42 a V.50.

tener relativa al comportamiento de nuestra descripción con las dos va  
riables externas que definen el proceso. Es decir, con el momento y la  
multiplicidad de la infección.

a) Los ajustes individuales permiten observar si la descripción de  
las curvas de lisis es adecuada independientemente del estado inicial  
al que corresponden. De esta forma es posible detectar situaciones en  
las que sistemáticamente la interpretación del proceso no fuera satis-  
factoria. De la misma forma se pueden poner de manifiesto curvas de li  
sis en las que aún siendo bien descritas, se obtienen valores de los -  
parámetros muy discrepantes con los obtenidos para el resto de ellos.  
Este tipo de ajuste individual permite además determinar hasta qué pun  
to puede extraerse información sobre el proceso, es decir, valores de  
los parámetros que se estimen de utilidad, a partir de una única curva  
de lisis. Por otra parte la comparación de los resultados obtenidos -  
con los correspondientes a los ajustes simultáneos proporciona informa  
ción sobre la validez interpretativa del modelo cuando se le proporcio  
nan datos correspondientes a situaciones experimentales que conducen a  
evoluciones del proceso muy diferentes. Es decir, podría ocurrir que en  
el modelo no se hubieran considerado adecuadamente los distintos facto-  
res que influyen en la lisis, lo que conduciría a que hubiera situacio-  
nes iniciales que no se describieran satisfactoriamente en los ajustes.  
Este efecto sería detectado al comparar la capacidad descriptiva del mo  
delo, curva por curva, con la correspondiente a un grupo de curvas iden  
tificadas por un mismo valor de una de las dos variables externas del -  
proceso de lisis.

b) Es importante estudiar, no sólo la bondad de la descripción obte  
nida con los diferentes tipos de ajuste, sino también los valores de -  
los parámetros que proporcionan. La compatibilidad de dichos valores o  
en su caso la dependencia con las variables que definen el proceso in-  
forma también, en mayor detalle, sobre la calidad interpretativa del mo  
delo y en su caso sobre el origen de las discrepancias.

c) Finalmente y dado que la estructura del programa de minimización  
numérica utilizado sólo permite ajustar 15 parámetros, no es posible -

esta finalidad y los 6 restantes son los que intervienen en la interpretación del proceso. Es por ello que los ajustes individuales y simultáneos por grupos de igual momento o multiplicidad de infección sustituyen, mediante promedio de los resultados y comprobación de la descripción obtenida con ellos, la información que se obtendría del ajuste simultáneo a todas las curvas de lisis.

A continuación presentamos, en tablas y figuras, los resultados obtenidos con los distintos tipos de ajustes. En las tablas aparecen los valores de los parámetros y su error obtenidos en cada ajuste, para las situaciones iniciales de momento y multiplicidad de infección que se especifican. Asimismo aparece la relación entre el valor del  $\chi^2$  obtenido y el número de grados de libertad, como indicador de la bondad estadística del ajuste. En las figuras se muestran en forma de líneas continuas la descripción obtenida de los datos experimentales.

A continuación presentamos una discusión general de los resultados seguida de su análisis, parámetro por parámetro, de dichos valores. Puede notarse que de todos los parámetros cuya contribución se estimó apropiada en la confección de la descripción numérica, aquél que corresponde al posible despegue de fagos durante el proceso de lisis ha estado ausente de los ajustes considerados definitivos. La razón es que en todos los ajustes preliminares, tanto en los realizados curva por curva como en los correspondientes a grupos de curvas, el parámetro ha convergido a valores siempre compatibles con cero, es decir, el proceso que interpreta no es necesario para describir la lisis en el grado de aproximación en el que trabajamos. Una evaluación del modelo a través de la comprobación de sus predicciones finaliza el capítulo de resultados.

### V.2.3 Discusión de resultados (Ajustes individuales).

En las figuras V.1 a V.36 se muestran los datos experimentales correspondientes a las curvas de lisis, junto a las proyecciones de los ajustes individuales en cada una de ellas. Puede observarse que el re-

Las tablas V.2 a V.5 muestran los valores obtenidos para los parámetros en cada uno de los ajustes referidos, así como el valor del  $\chi^2/ND$  (ND= número de grados de libertad) para cada uno de los mínimos. La buena interpretación de los datos queda cifrada en que el valor medio del cociente  $\chi^2/ND$  es aproximadamente 0.8, muy cercano a su valor más probable caso de que la descripción sea realmente la óptima. En relación con los valores obtenidos para los parámetros se observan fluctuaciones, casi siempre acordes con lo esperado teniendo en cuenta los errores obtenidos. Sólo en algún caso los datos experimentales no han permitido converger a un mínimo fiable debido fundamentalmente a que la infección ha tenido lugar cerca del máximo de la curva de crecimiento bacteriano y, consecuentemente, la sensibilidad de los datos a los parámetros de la lisis es muy pequeña. Un análisis más detallado de los resultados obtenidos parámetro por parámetro es el siguiente:

- Tiempo de generación del fago (T.G.). Los valores obtenidos oscilan en torno a 53 minutos salvo para aquellos casos, ya referidos, que no permiten determinar dicho parámetro con suficiente fiabilidad, en ajustes individuales. La sensibilidad media con una única curva de lisis en la determinación del parámetro, es decir el error, es del orden de 0 minutos, en acuerdo aproximado con las fluctuaciones observadas en los resultados. No parece existir dependencia sistemática de los valores obtenidos ni con el tiempo de infección ni con la multiplicidad.

- Parámetro que describe la aproximación de fagos a bacterias (K). Es éste un parámetro que fluctúa notablemente de ajuste a ajuste, aunque su error es grande haciéndose compatible con cero en la mayor parte de los ajustes. Naturalmente que el valor cero no tiene significación biológica, pero muestra afirmación es para indicar que la sensibilidad de los ajustes individuales al valor de este parámetro es muy pequeña y que, por tanto, no puede determinarse mediante el ajuste a una única curva de lisis. No obstante su valor medio (4) es compatible con el obtenido mediante la experimentación parcial expresamente realizada para la determinación del parámetro, descrita en IV.3.

tibles, no se presentan tampoco correlaciones claras con las dos variables del proceso de lisis y su valor medio es 32.

- Absorción de luz de los restos celulares ( $DO_M$ ). Es éste un parámetro que pretende determinar la relación entre la absorción de luz para una membrana producto de la explosión bacteriana y la bacteria, naturalmente en promedio. Los resultados obtenidos proporcionan un valor medio de  $7 \pm 3$  que es en efecto significativamente diferente de cero, pero muy pequeño. Quiere esto decir que la descripción del proceso de lisis, seguido mediante la medida de densidades ópticas, necesita tener en cuenta una pequeña corrección debida a la absorción de luz de los restos celulares. Los valores del parámetro no presentan correlación especial alguna con las variables que definen el proceso de lisis.

- Absorción de fagos a restos celulares ( M.E. ). El significado del parámetro ha sido convenientemente descrito en el capítulo III, pero los valores obtenidos indican su compatibilidad con cero dentro de los errores del ajuste, cuyo orden es, para cada una de las curvas, de aproximadamente el 20% de la capacidad de adherencia de los fagos a las bacterias. Por tanto es posible prescindir del parámetro, sabiendo que muestra descripción del proceso de lisis no necesita considerar el efecto que interpreta.

- Porcentaje de fagos "potentes". Puede observarse que para todos los ajustes obtenidos, el valor del parámetro oscila en torno al 50% con una sensibilidad aproximada del 10%, lo que implica un tamaño real de explosión real, en el sentido de detectable mediante los métodos experimentales utilizados, de 16. No obstante es conveniente hacer notar, y así lo destacaremos posteriormente, que el valor de dicho parámetro está fuertemente correlacionado con el correspondiente al tamaño de la explosión de tal forma que su supresión, aún afectando a la bondad de la descripción experimental, hace converger el tamaño de la explosión a valores compatibles con lo que hemos denominado tamaño de explosión real.

grandes, especialmente en alguno de ellos. Esto es indicativo de que con una única curva de lisis no se tiene sensibilidad suficiente para determinar con fiabilidad los parámetros que definen un modelo numérico complejo como el propuesto. Por esta razón, y para analizar más detenidamente la dependencia de los parámetros con las variables de la lisis hemos realizado ajustes simultáneos, agrupando aquellas curvas que corresponden a un mismo valor de cualquiera de las dos variables, momento y multiplicidad de la infección. Los resultados de tales ajustes y su discusión se presentan en lo que sigue.

#### IV.2.4 Discusión de resultados (Ajustes simultáneos a grupos de curvas de lisis de igual momento de infección).

Los cuatro momentos de infección elegidos son los correspondientes a densidades ópticas de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 unidades ópticas por mililitro y para cada uno de ellos se han determinado experimentalmente nueve curvas de lisis, con concentraciones que varían desde 1 fago por bacteria hasta 1 fago por 14580 bacterias. La relación decidida para las multiplicidades es tal, que para cada momento de la infección, el número de fagos introducidos varía de una a otra en un factor 3, salvo la multiplicidad 1/1.

Las figuras V.37 a V.40 muestran las proyecciones de los mejores ajustes superpuestas a los datos experimentales y en la tabla V.6 aparecen los valores de los parámetros para el mínimo, junto con los  $\chi^2/ND$  obtenidos. La relación media  $\chi^2/ND$  es muy cercana a 1 (0.94), lo que indica una adecuada descripción de los datos experimentales. El mismo valor para cada serie de curvas es tal que puede considerarse satisfactoria su descripción. La interpretación de los datos es también razonable observando las figuras V.37 a V.40. Como es lógico, los errores en los parámetros han disminuido de manera que la sensibilidad en su determinación ha aumentado notablemente. En particular, el parámetro que interpreta la aproximación de los fagos a las bacterias es ya significativamente distinto de cero, para una parte de los grupos de

ción de los fagos a los restos celulares, que sigue siendo compatible con cero, ahora con sensibilidades del orden del 10%. Este hecho es indicativo de que a nuestros niveles de aproximación, los fagos no parecen adherirse a los restos celulares. Es importante destacar que los resultados en estos ajustes son muy compatibles entre sí y estables, lo que les proporciona una alta fiabilidad. La bondad de los ajustes empeora muy ligeramente de considerar las curvas de lisis aisladas a considerarlas agrupadas por valores de momento de infección. Este hecho da confianza en que el modelo describe apropiadamente los datos experimentales independientemente de la variable momento de infección, fundamental en el proceso experimental en cuestión. Conviene hacer referencia a que la matriz de correlación de parámetros para cada una de las minimizaciones (no mostrada en ninguna tabla), indica una fuerte correlación entre los parámetros representativos del tamaño de la explosión y del porcentaje de "potencialidad" de los fagos en la infección. Aunque la interpretación de los datos experimentales parece necesitar de este último parámetro, la fuerte correlación indicada no permite tener una muy alta fiabilidad en su necesidad, que convendría comprobar experimentalmente. Más adelante volveremos a discutir el efecto descrito, encuadrándolo en la bibliografía apropiada que proporciona comprobaciones externas a nuestro trabajo. Lo que sí puede afirmarse como estable y necesario son los valores del tamaño "real" de la explosión, que serán discutidos, junto a los de los otros parámetros esenciales del modelo, al final del capítulo. La figura V.41 muestra la variación de los valores de los parámetros obtenidos con la variable momento de infección con objeto de estudiar posibles correlaciones. Estas no parecen existir, siendo todos ellos compatibles. Quizás el tamaño de la explosión muestra una ligera evolución descendente, cuando aumenta el tiempo al que tiene lugar la infección. Sin embargo, no puede afirmarse que exista una relación entre el tamaño de la explosión y el momento de infección, dado que la evolución observada no puede considerarse significativa. La posible constatación de este efecto requeriría la determinación de los valores del parámetro con mayor sensibilidad.



En esta sección presentamos los resultados obtenidos al ajustar - los nueve grupos de cuatro curvas que corresponden a procesos de lisis inducidos con igual concentración relativa inicial de fagos, pero a diferentes momentos de la infección. Cada uno de los grupos está constituido por cuatro curvas. El modelo utilizado en la descripción es el mismo que en los ajustes precedentes. Las figuras V.42 a V.50 muestran las proyecciones de los mejores ajustes, grupo por grupo, junto a los valores experimentales determinados para cada curva de lisis de cada grupo. En la tabla V.7 aparecen, de igual forma que en los casos precedentes, los valores óptimos de los parámetros para los mínimos obtenidos así como su error y el valor de la cantidad  $\chi^2/ND$ , indicativa de la bondad del ajuste. A partir de las figuras y la tabla puede deducirse que la descripción, aunque ligeramente inferior en promedio a la de los ajustes individuales e incluso a la de los ajustes correspondientes a grupos con el mismo momento de la infección, es no obstante razonable y puede admitirse como estadísticamente satisfactoria (el valor medio de la cantidad  $\chi^2/ND$  es 1.0 ). Quizás el valor de  $\chi^2/ND$  ha empeorado ligeramente por eventuales pequeños cambios en las condiciones experimentales dada la forma, ya descrita, en que se midieron las curvas de lisis. No obstante dichos cambios son estadísticamente inapreciables.

En relación con los valores de los parámetros los resultados muestran una compatibilidad entre sí y también con aquellos correspondientes a los ajustes ya descritos. Los errores en los parámetros son más pequeños que los correspondientes a los ajustes individuales aunque la precisión conseguida no permite, para algunos de ellos, determinar significativamente su valor.

La figura V.51 muestra el comportamiento de los valores óptimos de los parámetros con la variable del proceso que indica la concentración relativa de fagos. No se observa evolución alguna apreciable que indique la existencia de correlaciones.

descripciones de los datos, valores de los parámetros en acuerdo con los resultados anteriores y ausencia de efectos sistemáticos que podrían afectar a la fiabilidad del modelo teórico utilizado. A continuación presentamos una discusión sobre los valores de los parámetros más representativos y una comprobación experimental parcial e individualizada de dichos valores, sólo para los parámetros más importantes, que son a su vez los más accesibles a dicho tipo de experimentación.

#### V.2.6 Discusión general y comprobación experimental de los resultados.

Puesto que nuestro programa de minimización no permitía el ajuste de más de 9 curvas simultáneamente, los valores finales de los parámetros, representativos de lo que sería un ajuste global a las 36 curvas de lisis, han sido estimados como promedio de los obtenidos en los ajustes a los 4 grupos de igual momento de infección. Este cálculo es razonable dada la compatibilidad de los resultados en dichos ajustes. Los valores obtenidos para los parámetros, con los errores estadísticos correspondientes, aparecen a continuación:

- 1 - Tiempo de generación del fago =  $53 \pm 2$  min
- 2 - Velocidad de aproximación fago-bacteria =  $(5.5 \pm 1.7) \times 10^{-5}$  ml/min
- 3 - Tamaño de la explosión bacteriana =  $31 \pm 1$  fagos/bacteria
- 4 - Porcentaje de absorción de luz de los restos celulares =  $6.5 \pm 0.5$   
(relativo a la absorción de bacterias)
- 5 - Porcentaje de fagos aproximados a restos celulares =  $0.07 \pm 0.04$   
(relativo a la aproximación de bacterias)
- 6 - Factor de "potencialidad" =  $0.47 \pm 0.02$

Puede observarse que de todos ellos el parámetros que interpreta la aproximación de fagos a restos celulares es compatible con cero en menos de 2 desviaciones típicas, considerando sólo el error estadístico, lo cual es indicativo de que tal parámetro no es imprescindible, -

tes de las explosiones bacterianas. (Experimentalmente se han realizado determinaciones del número de fagos libres en función del tiempo en suspensiones de fagos y membranas celulares preparadas según el método de Weidel et al (1960). Después de 40 minutos no se observaron disminuciones en el número de fagos superiores al 10% del valor inicial).

El parámetro que interpreta la fracción relativa entre la absorción de luz de los restos celulares y las bacterias es, aunque pequeño, 6%, significativamente distinto de cero, y nuestro modelo parece necesitarlo para una descripción estadísticamente satisfactoria de los datos experimentales. Sin embargo el hecho de que su valor sea pequeño implica que en una primera aproximación, es decir, cuando se estudia una única curva de lisis, su efecto es desechable.

Quizás los parámetros con significación biológica mayor son los relativos al tiempo de generación del fago, el tamaño de la explosión bacteriana, el porcentaje de fagos potentes y la velocidad del proceso de aproximación del fago a la bacteria. Todos ellos, a excepción del porcentaje de fagos potentes, son comprobables con los métodos experimentales que hemos utilizado. En concreto, para la determinación experimental del tiempo de generación y el tamaño de la explosión y con objeto de probar la validez de los resultados obtenidos, hemos utilizado el método expuesto en II. 10. De acuerdo con él, la figura V.52 muestra los valores del número de bacterias infectadas en función del tiempo, para un intervalo inmediatamente posterior a la infección. Estos valores permiten determinar los dos parámetros referidos de la forma siguiente:

- Puede observarse que inmediatamente después de la infección el número de bacterias permanece aproximadamente constante, y que a partir de 40 min crece exponencialmente hasta 55 min, momento en que vuelve a estabilizarse. Esto quiere decir que las explosiones bacterianas han tenido lugar en el intervalo 40-55 minutos referido, lo que proporciona un tiempo de generación aproximado de  $47 \pm 4$  min. (El error ha sido estimado de forma aproximada y sin estudiar en detalle las convoluciones

terias explotan tras el mismo tiempo de generación, sino que existirá un valor promedio y una dispersión en torno a dicho valor. El valor obtenido con este tipo de experimentación parcial es compatible dentro de poco más de una desviación típica con el que nos proporciona el modelo numérico interpretativo de la lisis, siendo indicativo de su verosimilitud.

- La relación entre el número de bacterias en la fase posterior a su crecimiento y el correspondiente a la fase anterior, nos proporciona el tamaño de la explosión. Ahora bien, dicho tamaño de la explosión se refiere a aquella fracción de los fagos que procediendo de ella son capaces de provocar infecciones posteriores, es decir, lo que hemos llamado fagos potentes. Dicha relación debe ser entonces comparada con el producto de los valores obtenidos para el tamaño de la explosión del fago y el porcentaje de fagos potentes. Utilizando los valores proporcionados por el modelo, obtenemos  $15 \pm 1$  y si se calcula la relación antes referida sobre los valores que aparecen en la figura V.51, se obtiene  $19 \pm 4$ , perfectamente compatible con el anterior, lo que de nuevo comprueba la validez de nuestro modelo.

Es interesante insistir en que aunque el error estadístico que se obtiene en el parámetro que interpreta el porcentaje de fagos potentes es pequeño, dicho parámetro, de acuerdo con la matriz de correlación que proporcionan los ajustes, está estrechamente correlacionado con el parámetro que interpreta el tamaño de la explosión. Una variación en uno de los dos proporciona un mínimo para el otro de forma que el producto de ambos es siempre aproximadamente 15. Esto quiere decir que aunque nuestro modelo parece necesitar el parámetro "porcentaje de fagos potentes" para interpretar los datos, no tenemos la seguridad que proporciona el error estadístico de que biológicamente es así el proceso. Sin embargo, y aunque no hayamos hecho comprobación experimental parcial del parámetro, está en acuerdo con los valores citados en la bibliografía. Concretamente la determinación del porcentaje de fagos  $\lambda$  "potentes" proporciona según Karamata et al. (1962) un valor de 0.5 aproximadamente. Es por ello que sin olvidar la fuerte correlación detecta

considerarse con significación. En relación con el parámetro que interpreta la aproximación de fagos a bacterias su valor es compatible con el que se determinó experimentalmente mediante el método descrito en IV.3. Aunque tal método por utilizar extrapolaciones proporcione errores muy grandes y la comprobación que aporte sea imprecisa.

En resumen, el modelo descrito ha interpretado satisfactoriamente los datos experimentales correspondientes a 36 curvas de lisis obtenidas mediante medidas de densidad óptica. Su formulación en términos de parámetros con contenido biológico ha permitido, midiendo algunos de ellos, verificar su validez.

Finalmente queremos hacer referencia a las posibilidades de aplicación que ofrece el modelo. Aunque algunas de ellas requieren ligeras modificaciones, su introducción en la parametrización descrita es relativamente simple.

Una de las aplicaciones inmediatas, de utilidad en aquellos procesos cuya finalidad sea la obtención de fagos en condiciones preparativas, es la determinación del momento y multiplicidad de la infección idóneos para una optimización en el rendimiento final de fagos. En el caso que nos ocupa, y puesto que en su estado actual el modelo proporciona la evolución con el tiempo del número de fagos, hemos podido observar diferencias en los rendimientos finales en un factor 10.

Pensamos que la formulación descrita es general y por tanto aplicable a otros procesos de lisis en los que el fago y la bacteria tengan ciclos de vida semejantes a los de los estudiados. Es decir, bacterias y fagos de ciclo lítico, creciendo en sistemas cerrados, en medio líquido.

Otra posible utilización del modelo es el estudio de los efectos causados, tanto al fago como a la bacteria, por diversos tratamientos y condiciones ambientales. Por ejemplo puede pensarse que la adsorción del fago a bacteria está condicionada por factores como la presencia de cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) sin afectar a otras fases del pro-

ejemplo es el de la temperatura que en el crecimiento del fago pueden tener las condiciones ambientales que cambian el tiempo de generación de la bacteria. Es conocido que algunos antibióticos, aún no siendo específicos de fagos, en ciertos rangos de concentración pueden ejercer un efecto selectivo entre el fago y la bacteria huésped. Tales efectos, por ejemplo - el descenso en el tamaño de la explosión, podrían ser evaluados con la - descripción numérica expuesta.

TABLA V.1 Momentos y multiplicidades de infección correspondientes a 36 curvas de lisis. Cada situación experimental concreta de momento y multiplicidad de infección tiene asignado un número, que aparece entre paréntesis, y que facilita su posterior identificación en las figuras V.37 a V.40 y V.42 a V.50.

TABLAS V.2 a V.5 Resultados de los ajustes individuales obtenidos para las 36 curvas de lisis. En todas ellas aparece, para cada multiplicidad de infección (M.I.), los valores óptimos de los parámetros: tiempo de generación del fago (T.G.), velocidad de aproximación fago-bacteria ( $K_{\text{aprox}}$ ), tamaño de la explosión (T.E.), fracción de luz absorbida por los restos celulares respecto a las bacterias (% D.O.), relación entre la absorción de fagos a restos celulares y a bacterias (M.E.), porcentaje de fagos "potentes" (F.P.). En la última columna aparece el valor de la relación  $\chi^2/\text{ND}$ .

TABLA V.6 Resultado de los ajustes simultáneos de 9 curvas de lisis para cada uno de los 4 momentos de infección que se especifican. Se muestran los valores de los parámetros T.G.,  $K_{\text{aprox}}$ , T.E., % D.O., M.E. y F.P. así como la relación  $\chi^2/\text{ND}$ .

TABLA V.7 Resultados de los ajustes simultáneos de 4 curvas de lisis correspondientes a las 9 multiplicidades de infección que aparecen en la primera columna. Se muestran los valores de los parámetros T.G.,  $K_{\text{aprox}}$ , T.E., % D.O., M.E. y F.P. así como la relación  $\chi^2/\text{ND}$ .

MULTIPLICIDAD DE LA INFECCION (Nº DE CURVA)

Momento de  
la infección  
( $\mu$ .o/ml)

0.5	1/1(1)	1/7(2)	1/20(3)	1/60(4)	1/180(5)	1/540(6)	1/1620(7)	1/4860(8)
1.0	1/1(10)	1/7(11)	1/20(12)	1/60(13)	1/180(14)	1/540(15)	1/1620(16)	1/4860(17)
2.0	1/1(19)	1/7(20)	1/20(21)	1/60(22)	1/180(23)	1/540(24)	1/1620(25)	1/4860(26)
3.0	1/1(28)	1/7(29)	1/20(30)	1/60(31)	1/180(32)	1/540(33)	1/1620(34)	1/4860(35)

TABLA V.1



RESULTADOS AJUSTES INDIVIDUALES (Mom. Inf. 0.5 u.o/ml)

M.I.	TG (min)	$K_{aprox} \times 10^{-5}$ (ml/min)	T.E. (nº fagos por bacteria)	% D.O.	M.E.	F.P.	$\chi^2/ND$
1/1	46 ± 10	4 ± 7	28 ± 6	5 ± 3	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.2/11
1/7	38 ± 10	4 ± 7	32 ± 5	5 ± 3	0.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1	6.5/7
1/20	50 ± 10	2 ± 7	30 ± 6	6 ± 3	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.2	19/11
1/60	51 ± 11	6 ± 8	35 ± 6	7 ± 3	0.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1	6.3/12
1/180	46 ± 10	6 ± 6	46 ± 6	7 ± 2	0.0 ± 0.3	0.5 ± 0.1	11/7
1/540	48 ± 10	7 ± 7	40 ± 6	6 ± 2	0.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1	14/8
1/1620	46 ± 10	10 ± 7	45 ± 6	6 ± 3	0.0 ± 0.3	0.32 ± 0.2	16/9
1/4860	54 ± 10	11 ± 8	41 ± 6	8 ± 2	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	8/12
1/14860	61 ± 11	2 ± 7	33 ± 5	3 ± 2	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	12/12

TABLA V.2

RESULTADOS AJUSTES INDIVIDUALES (Mon. Inf. 1.0 u.o/ml)

M.I.	TG(min)	Kaprox $\times 10^{-5}$ (ml/min)	T.E. (nº fagos por bacteria)	% DO	M.E.	P.P.	$\times^2$ /ND
1/1	57 $\pm$ 10	4 $\pm$ 7	31 $\pm$ 6	4 $\pm$ 3	0.3 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	14/15
1/7	58 $\pm$ 11	4 $\pm$ 8	38 $\pm$ 6	4 $\pm$ 3	0.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	9/14
1/20	56 $\pm$ 10	4 $\pm$ 7	32 $\pm$ 5	6 $\pm$ 3	0.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	15/17
1/60	56 $\pm$ 10	4 $\pm$ 7	31 $\pm$ 5	6 $\pm$ 3	0.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	8/17
1/180	55 $\pm$ 9	3 $\pm$ 8	31 $\pm$ 6	5 $\pm$ 2	0.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	5/17
1/540	57 $\pm$ 10	4 $\pm$ 7	33 $\pm$ 6	6 $\pm$ 3	0.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	27/17
1/1620	56 $\pm$ 9	4 $\pm$ 7	24 $\pm$ 6	6 $\pm$ 3	0.0 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	29/17
1/4860	56 $\pm$ 10	4 $\pm$ 7	29 $\pm$ 6	6 $\pm$ 3	0.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	27/19
1/14860	57 $\pm$ 10	8 $\pm$ 8	28 $\pm$ 6	6 $\pm$ 3	0.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	10/19

TABLA V.3

RESULTADOS AJUSTES INDIVIDUALES (momentos de la infección 2.0 u.o/ml)

M.I.	TG(min)	$K_{aprox} \times 10^{-5}$ (ml/min)	T.E. Nº fagos por bacteria	% D.O	M.E.	F.P.	$\chi^2/ND$
1/1	54 ± 9	4 ± 7	26 ± 6	7 ± 3	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	11/16
1/7	44 ± 10	4 ± 6	30 ± 6	7 ± 3	0.0 ± 0.3	0.5 ± 0.1	3/12
1/20	50 ± 10	5 ± 7	61 ± 6	7 ± 3	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.1	12/12
1/60	51 ± 10	5 ± 7	32 ± 5	7 ± 3	0.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1	6/11
1/180	43 ± 10	4 ± 7	16 ± 6	6 ± 3	0.0 ± 0.3	0.7 ± 0.1	14/13
1/540	52 ± 10	4 ± 6	29 ± 6	7 ± 3	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.1	5/18
1/1620	60 ± 10	7 ± 7	31 ± 6	7 ± 3	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	17/18
1/4860	52 ± 9	5 ± 7	32 ± 6	8 ± 3	0.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	10/16
1/14860	52 ± 10	4 ± 7	28 ± 6	7 ± 3	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	15/16

TABLA V.4

RESULTADOS AJUSTES INDIVIDUALES (Mom. Inf. 3.0 u.o/ml)

M.I.	TG (min)	$K_{\text{aprox}} \times 10^{-5}$ (ml/min)	T.E. (nº fagos por bacteria)	% D.O.	M.E.	F.P.	$\chi^2/\text{ND}$
1/1	63 ± 10	4 ± 7	18 ± 6	7 ± 3	0.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1	6.9/12
1/7	57 ± 10	3 ± 6	33 ± 6	7 ± 3	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	7.8/12
1/20	46 ± 10	4 ± 7	24 ± 6	11 ± 3	0.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1	6.0/16
1/60	51 ± 9	2 ± 7	30 ± 5	15 ± 3	0.0 ± 0.3	0.5 ± 0.1	5.7/16
1/180	52 ± 10	1 ± 7	43 ± 6	8 ± 2	0.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1	5.1/18
1/540	61 ± 10	1 ± 7	37 ± 5	6 ± 2	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1	4.0/17
1/1620	56 ± 9	3 ± 7	30 ± 6	5 ± 2	0.0 ± 0.3	0.5 ± 0.1	9.4/18
1/4860	51 ± 10	1 ± 7	30 ± 6	0 ± 3	0.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	5/16
1/14860	54 ± 10	9 ± 7	7 ± 6	13 ± 3	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	6.3/18

TABLA V.5

RESULTADOS AJUSTES SIMULTANEOS DE GRUPOS DE CURVAS DE LISIS DE IGUAL MOMENTO DE INFECCION

Grupo de curvas de lisis de mo- mento infección (u.o/ml)	TG (min)	$K_{aprox} \times 10^{-5}$ (ml/min)	T.E. (nº fagos por bacteria)	% D.O.	M.E.	F.P.	$\times 2 /$
0.5	47 ± 4	10 ± 4	34 ± 3	6 ± 1	0.0 ± 0.1	0.44 ± .04	159
1.0	56 ± 4	4 ± 3	31 ± 2	6 ± 1	0.0 ± 0.1	0.52 ± 0.05	208
2.0	51 ± 4	8 ± 4	30 ± 2	7 ± 1	0.2 ± 0.1	0.50 ± 0.04	155
3.0	55 ± 3	3 ± 3	29 ± 2	8 ± 1	0.1 ± 0.1	0.45 ± 0.04	133

TABLA V.6

RESULTADOS AJUSTES SIMULTANEOS DE GRUPOS DE CURVAS DE LISIS DE LISIS DE IGUAL MULTIPLICIDAD DE INFECCION

Grupo de curvas de lisis de mul- tiplicidad de infección	TG (min)	$K_{aprox} \times 10^{-5}$ (ml/min)	T.E. (nº fagos por bacteria)	% D.O.	M.E.	F.P.	$\chi^2$
1/1	50 ± 5	3 ± 5	30 ± 3	6 ± 2	0.0 ± 0.1	0.50 ± 0.05	76,
1/7	52 ± 6	3 ± 5	32 ± 3	6 ± 1	0.0 ± 0.1	0.47 ± 0.06	58,
1/20	53 ± 6	13 ± 6	40 ± 3	7 ± 2	0.0 ± 0.1	0.51 ± 0.06	89,
1/60	47 ± 6	10 ± 5	32 ± 3	7 ± 2	0.0 ± 0.1	0.51 ± 0.06	73,
1/180	41 ± 6	10 ± 5	29 ± 3	7 ± 1	0.0 ± 0.1	0.49 ± 0.05	73,
1/540	51 ± 6	10 ± 5	34 ± 3	6 ± 2	0.0 ± 0.1	0.54 ± 0.06	96,
1/1620	55 ± 5	3 ± 5	30 ± 3	6 ± 1	0.0 ± 0.2	0.46 ± 0.05	78,
1/4860	54 ± 6	12 ± 6	41 ± 3	9 ± 2	0.0 ± 0.1	0.54 ± 0.06	96,
1/14860	54 ± 5	9 ± 5	36 ± 3	8 ± 2	0.0 ± 0.1	0.55 ± 0.05	62,

TABLA V.7

FIGURAS V.1 a V.36 Se muestra la evolución de los datos experimentales - correspondientes a 36 curvas de lisis junto a las proyecciones de los ajustes individuales realizados para cada una de ellas (línea continua). En ordenadas se representa la densidad óptica medida en función del tiempo (minutos) transformada en logaritmo neperiano del número de bacterias. El significado del asterisco que aparece en todas las figuras se expuso en el texto en la sección V.2.1.

FIGURAS V.37 a V.40 Muestran la proyección de los ajustes simultáneos de 9 curvas de lisis, correspondientes a los 4 momentos de infección: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 u.o/ml, superpuestas a los datos experimentales. En ordenadas y abscisas se representan las mismas variables que en las figuras V.1 a V.36. La situación inicial a que corresponde cada curva de lisis se identifica por un número cuyo significado puede verse en la tabla V.1

FIGURA V.41 Muestra la evolución de los 6 parámetros determinados en los ajustes en función del momento de la infección. El simbolismo utilizado para identificar a los parámetros es el mismo - que el que se empleó en las tablas V.1 a V.7 (T.G., K aprox, T.E., % D.O., M.E., F.P.).

FIGURAS V.42 a V.50 Muestran la proyección de los ajustes simultáneos de 4 curvas de lisis, correspondientes a 9 multiplicidades de infección superpuestas a los datos experimentales. En ordenadas y abscisas se representan las mismas variables que en las figuras V.1 a V.36. La situación inicial a que corresponde cada curva de lisis se identifica por un número cuyo significado puede verse en la tabla V.1.

FIGURA V.51 Muestra la evolución de los 6 parámetros determinados en los ajustes, en función de la multiplicidad de la infección - (transformada en logaritmos neperianos por su mayor facilidad de representación). El simbolismo utilizado para identi-

blas V.1 a V.7.

FIGURA V.52 Se representa la evolución del número de bacterias infectadas en función del tiempo.



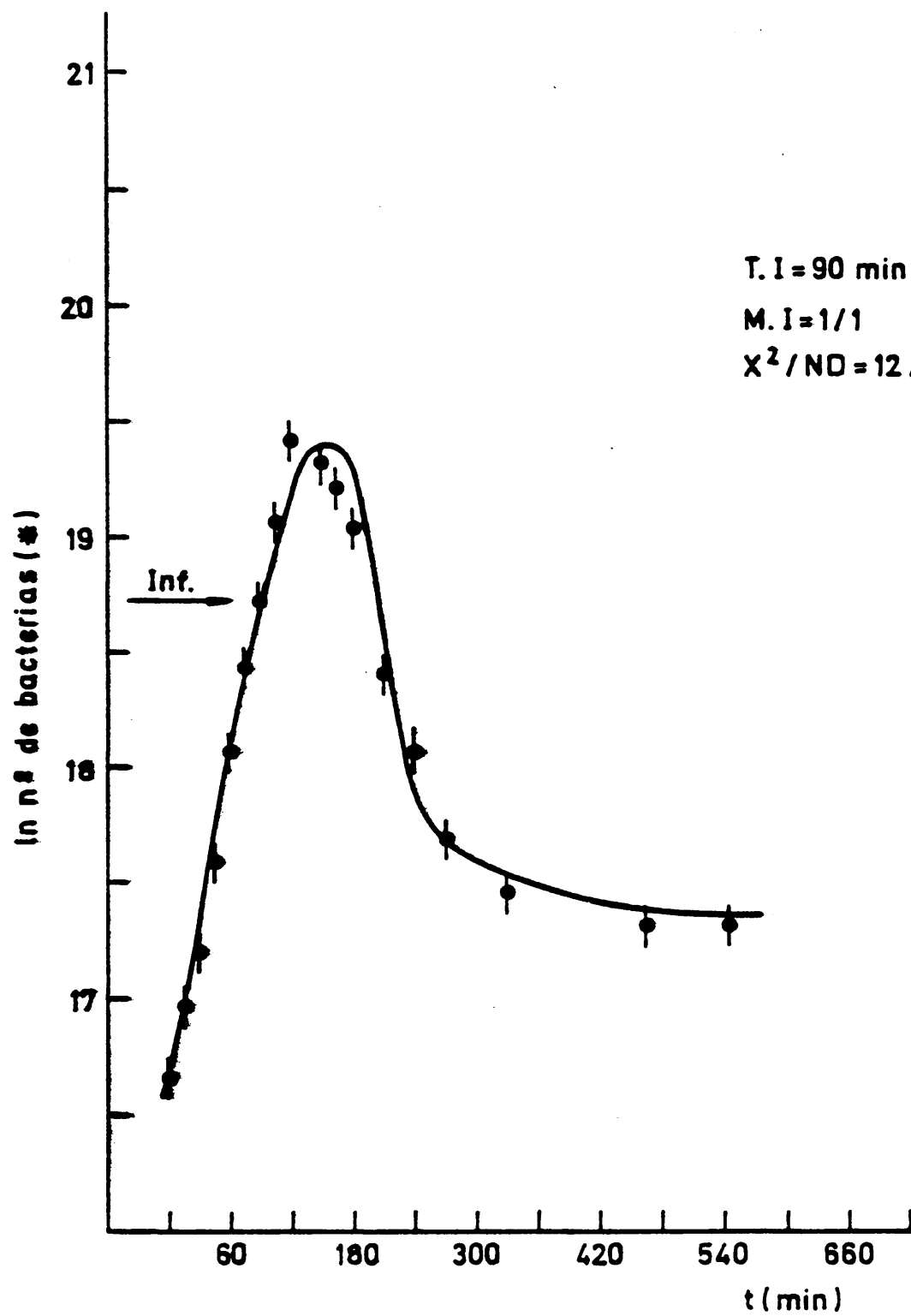


FIG V-1

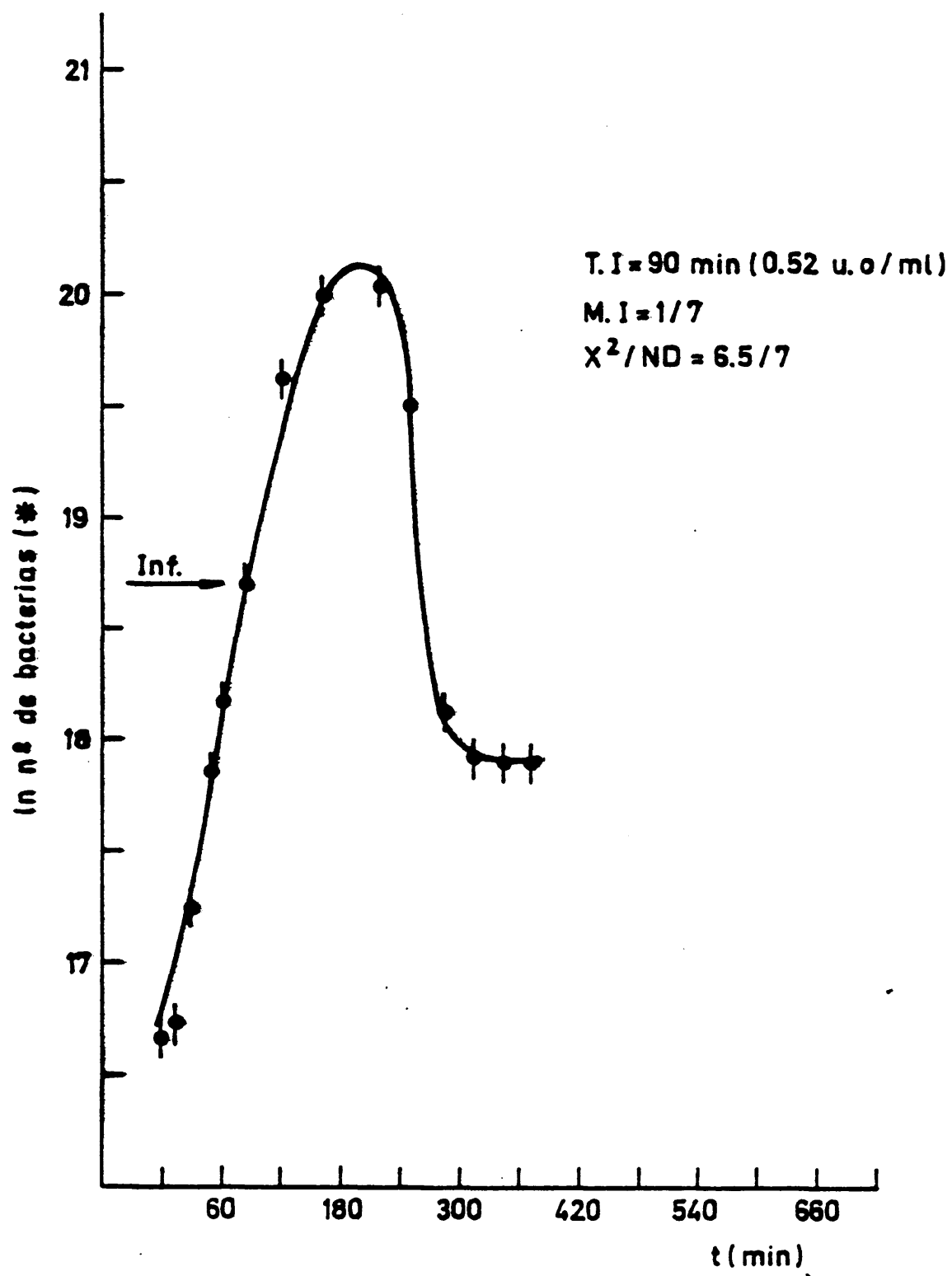


FIG. V - 2

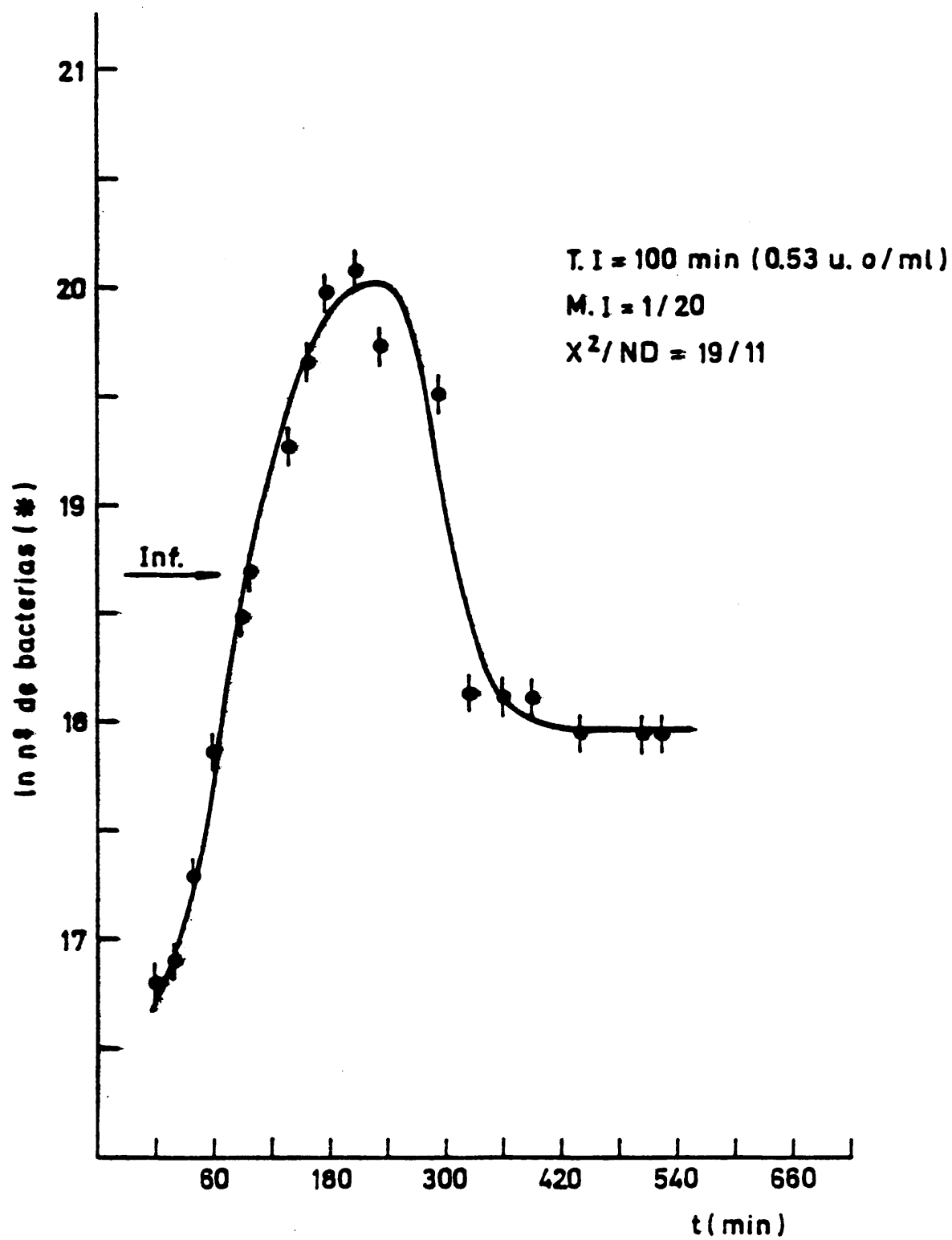


FIG. V-3

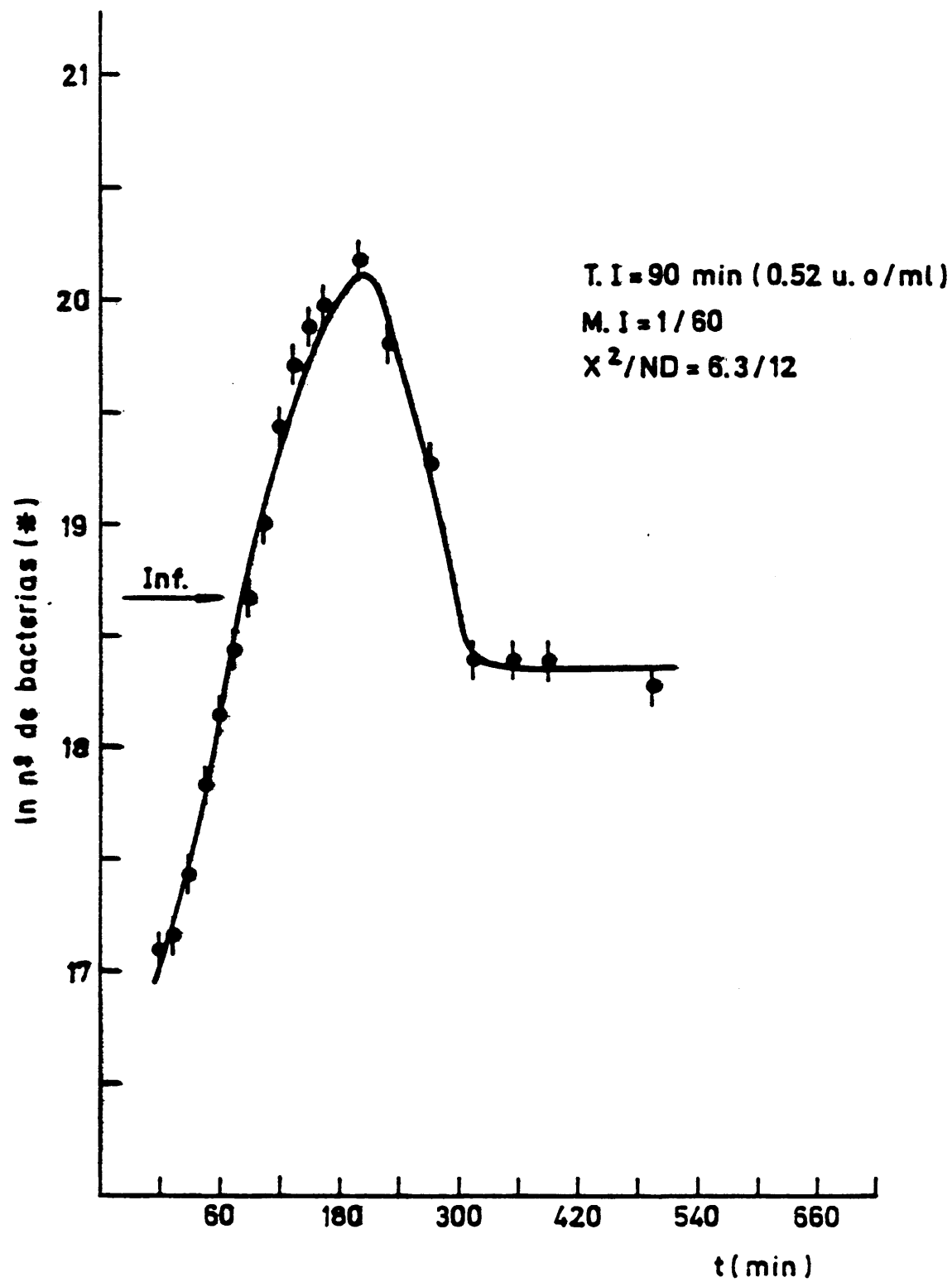


FIG. V-4

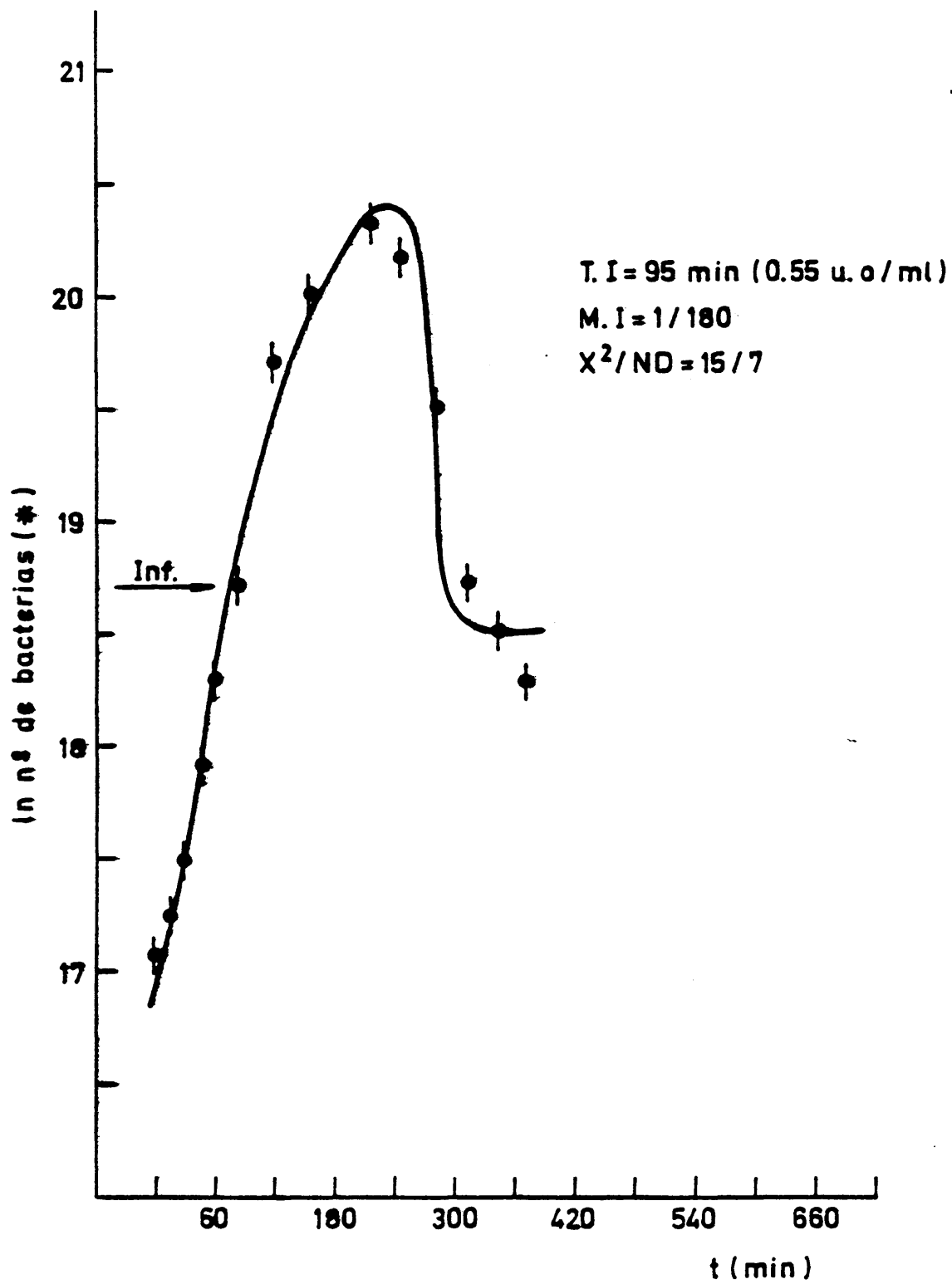


FIG. V-5

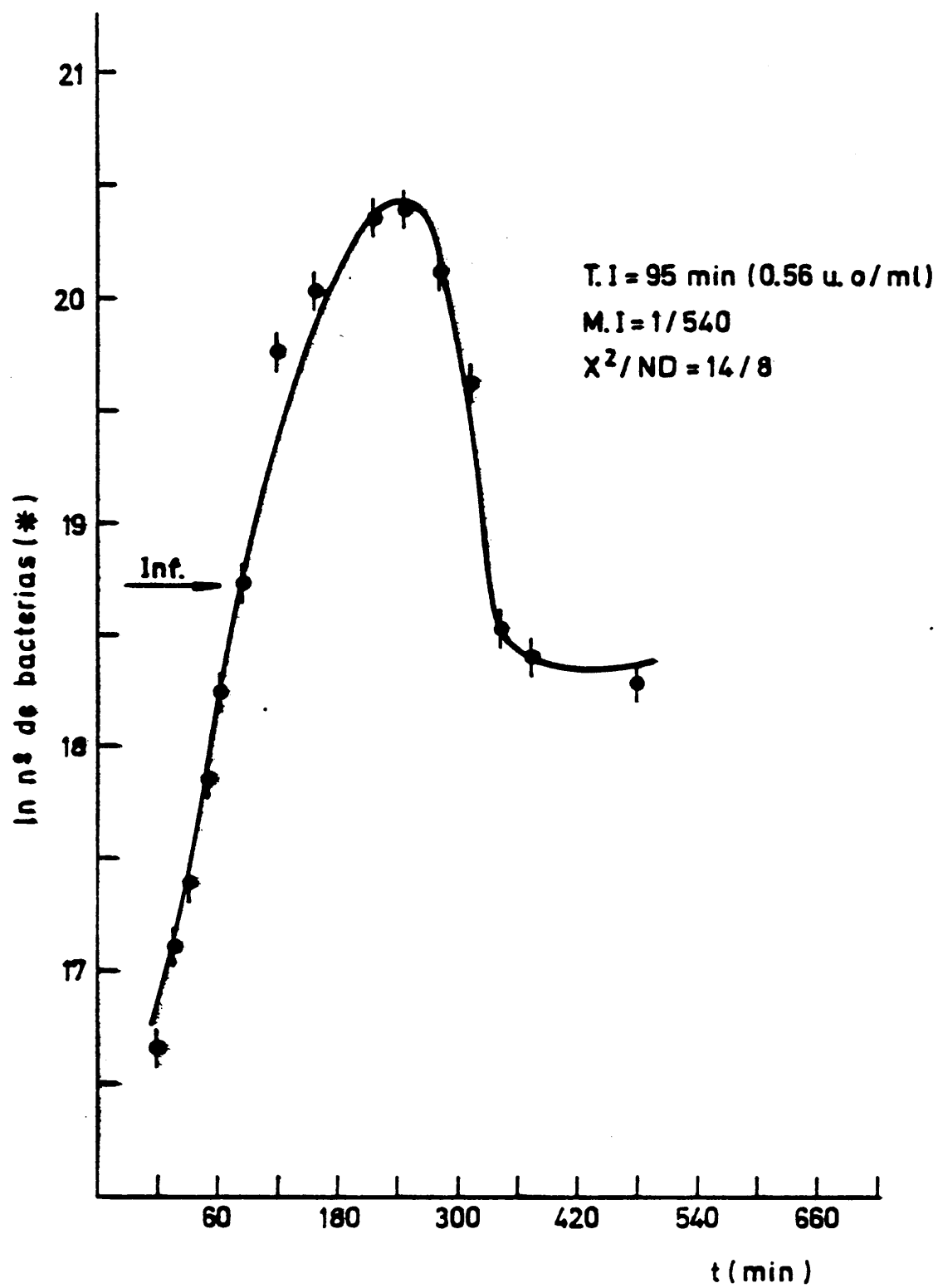


FIG. V - 6

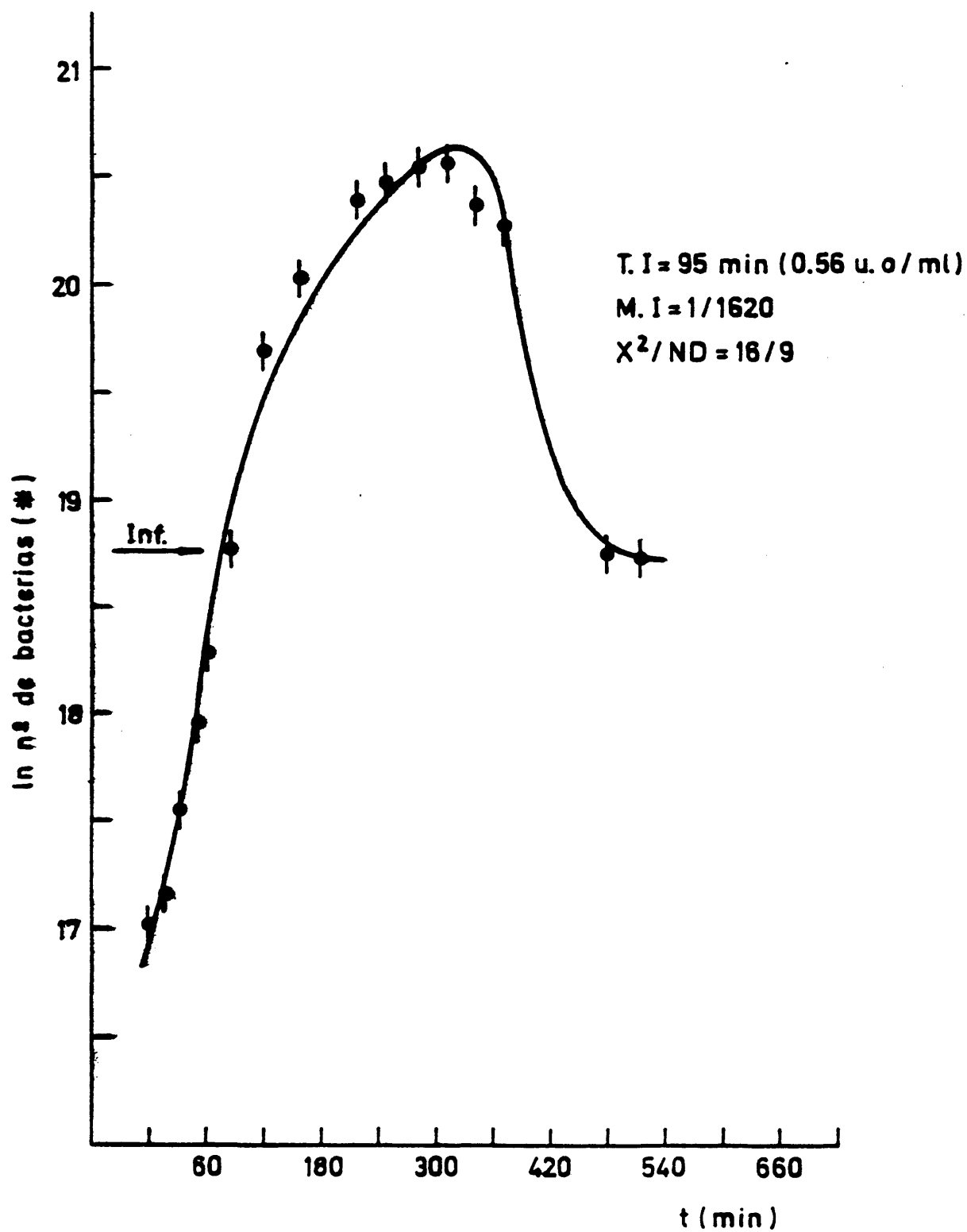


FIG. V-7

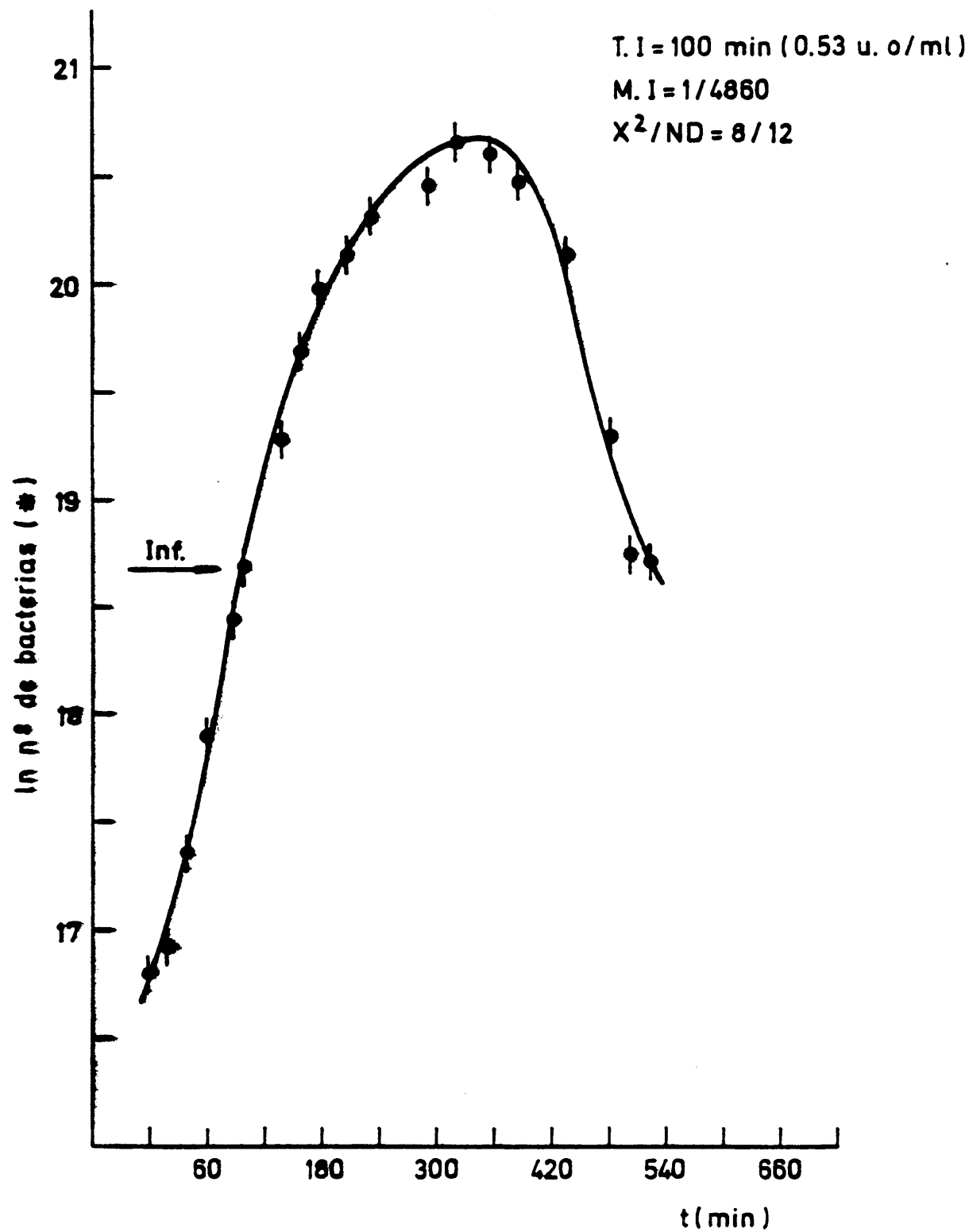


FIG. V-8



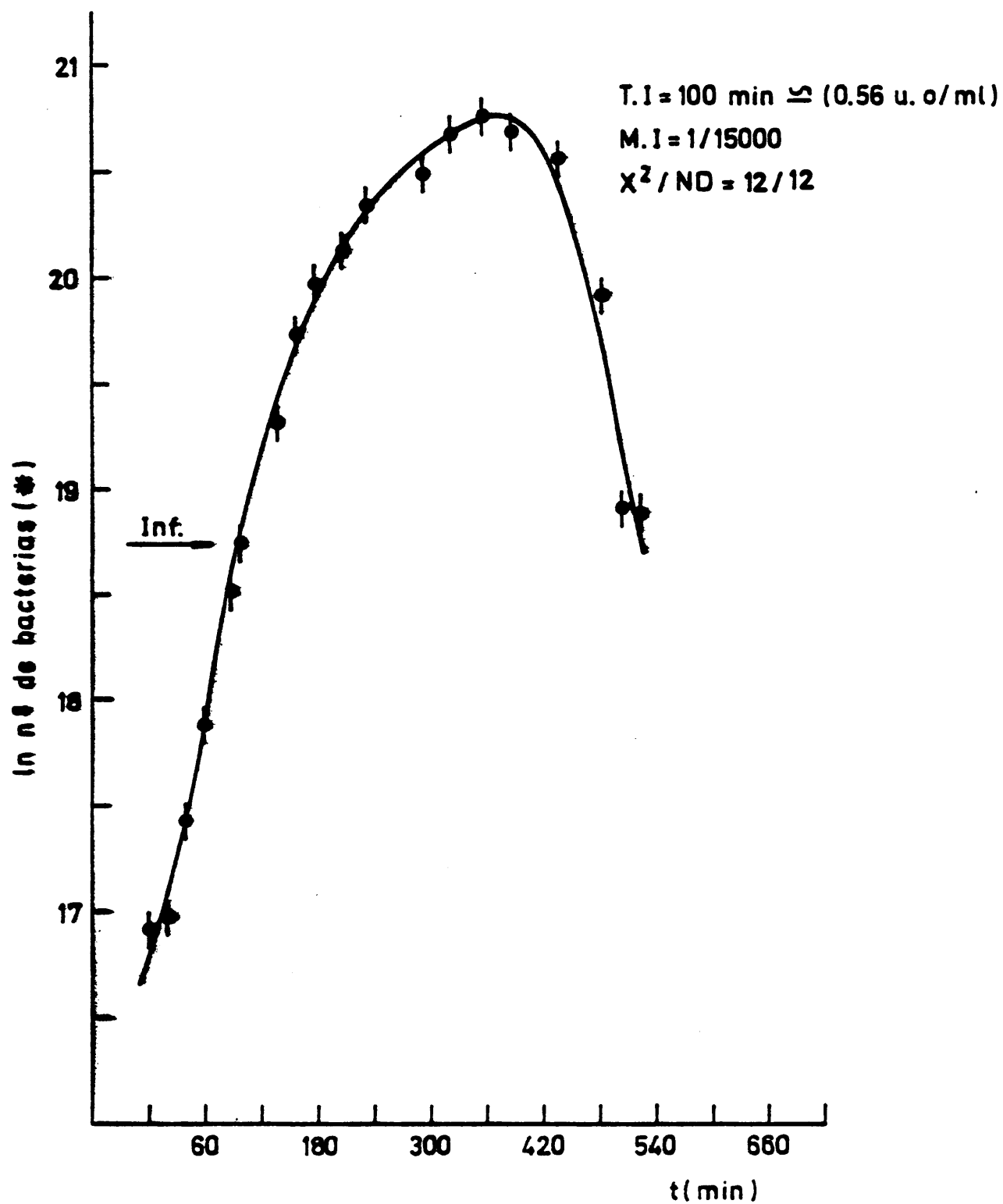


FIG. V-9

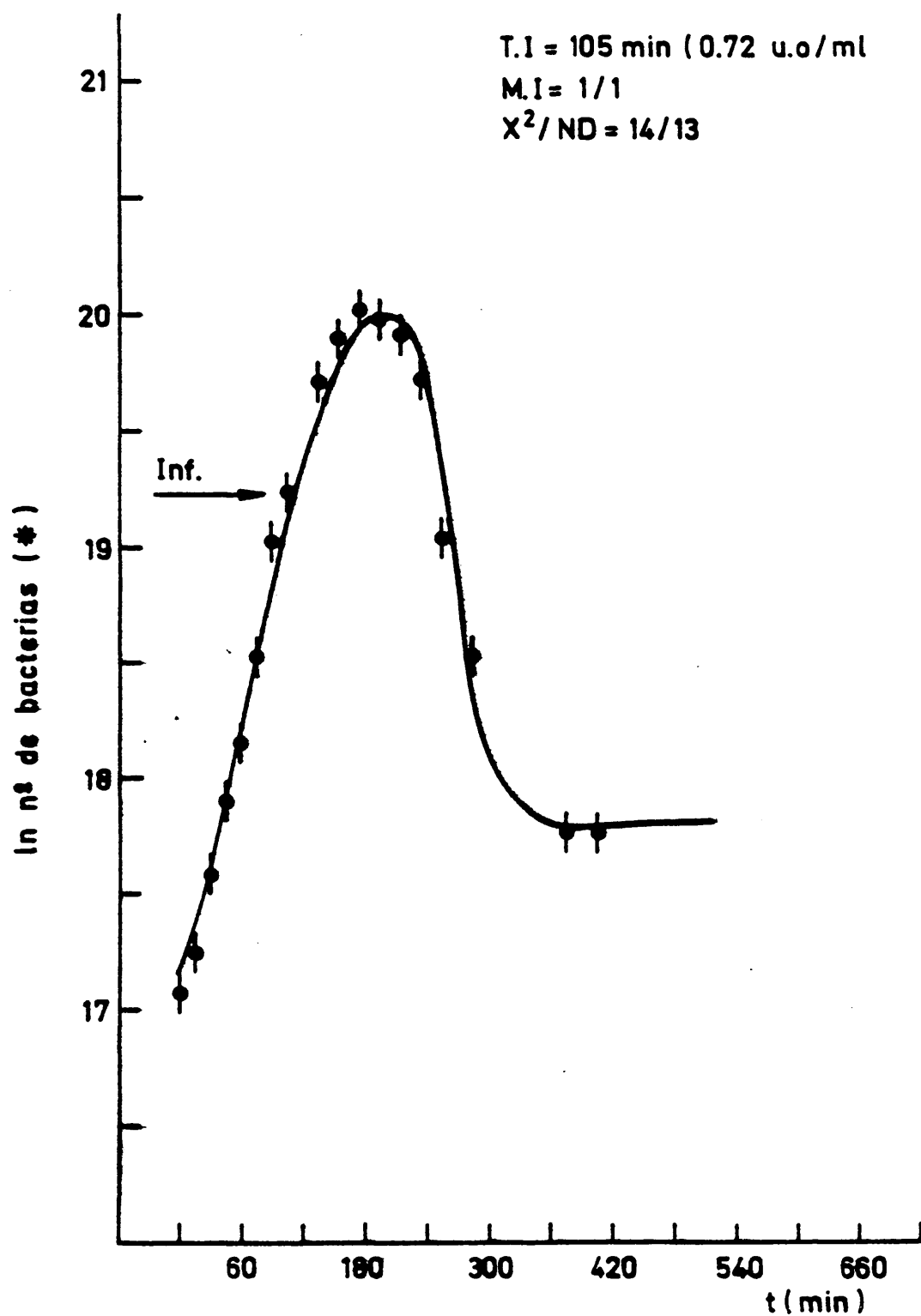


FIG. V-10

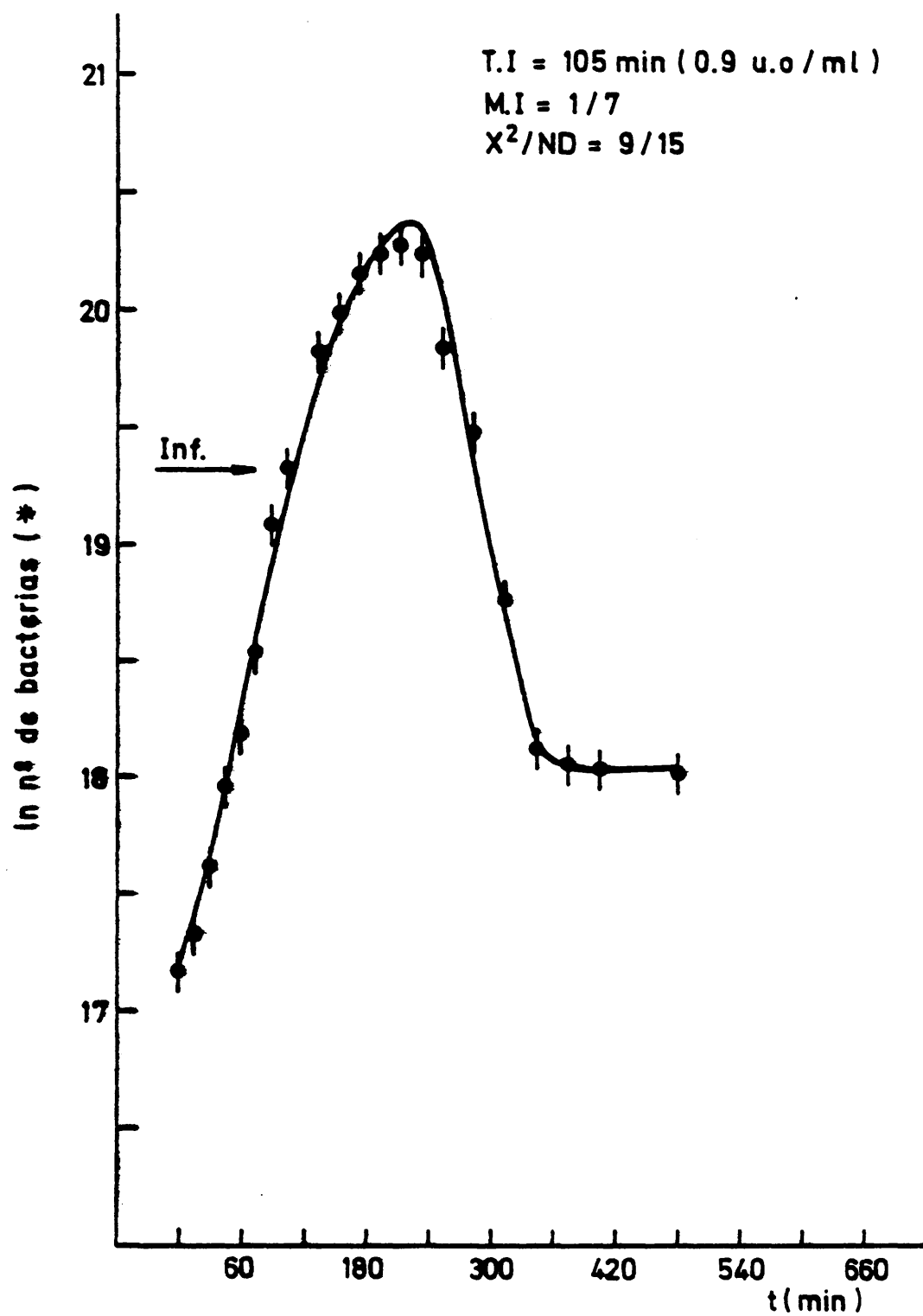


FIG. V - 11

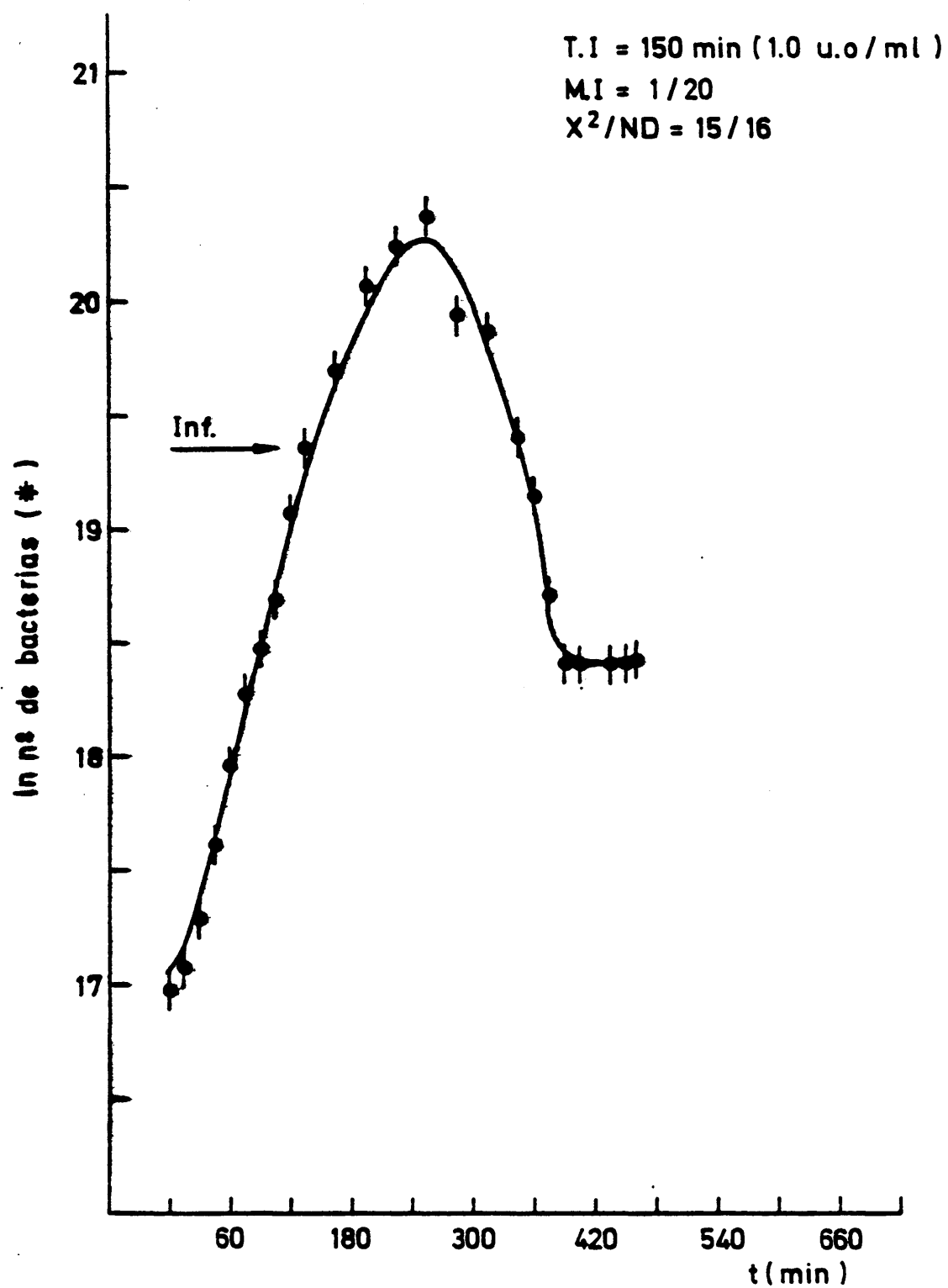


FIG. V-12

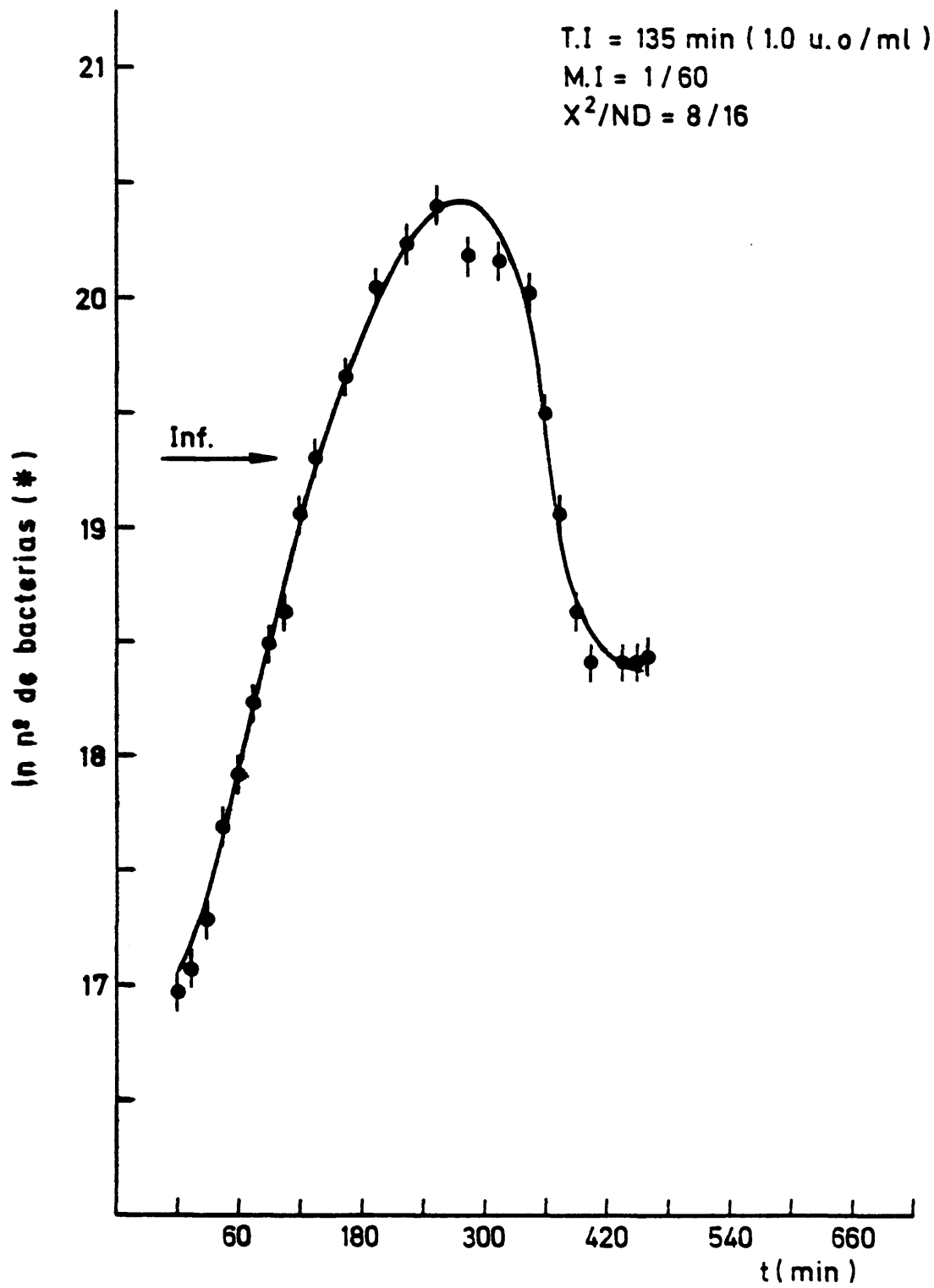


FIG. V-13

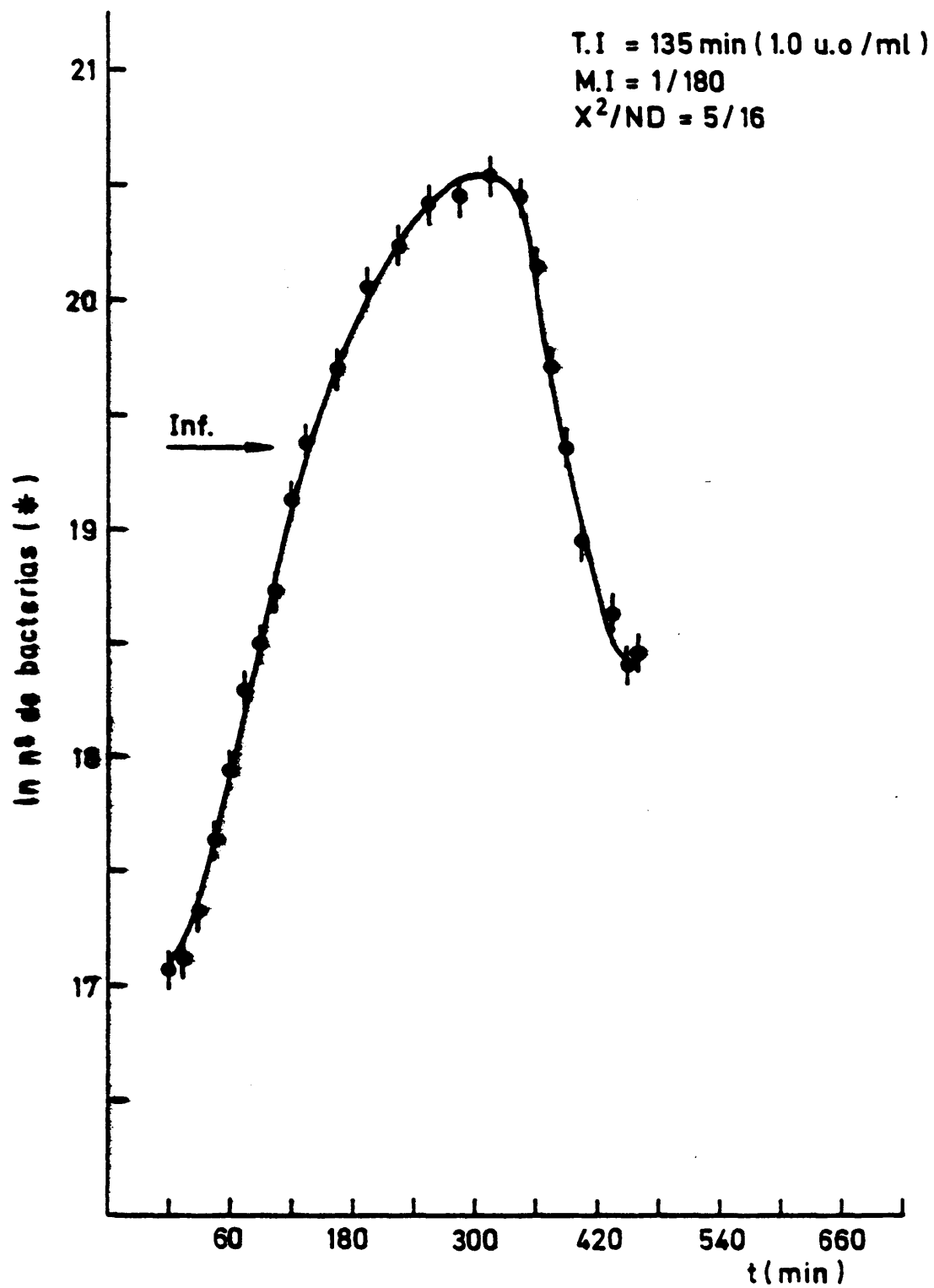


FIG. V-14

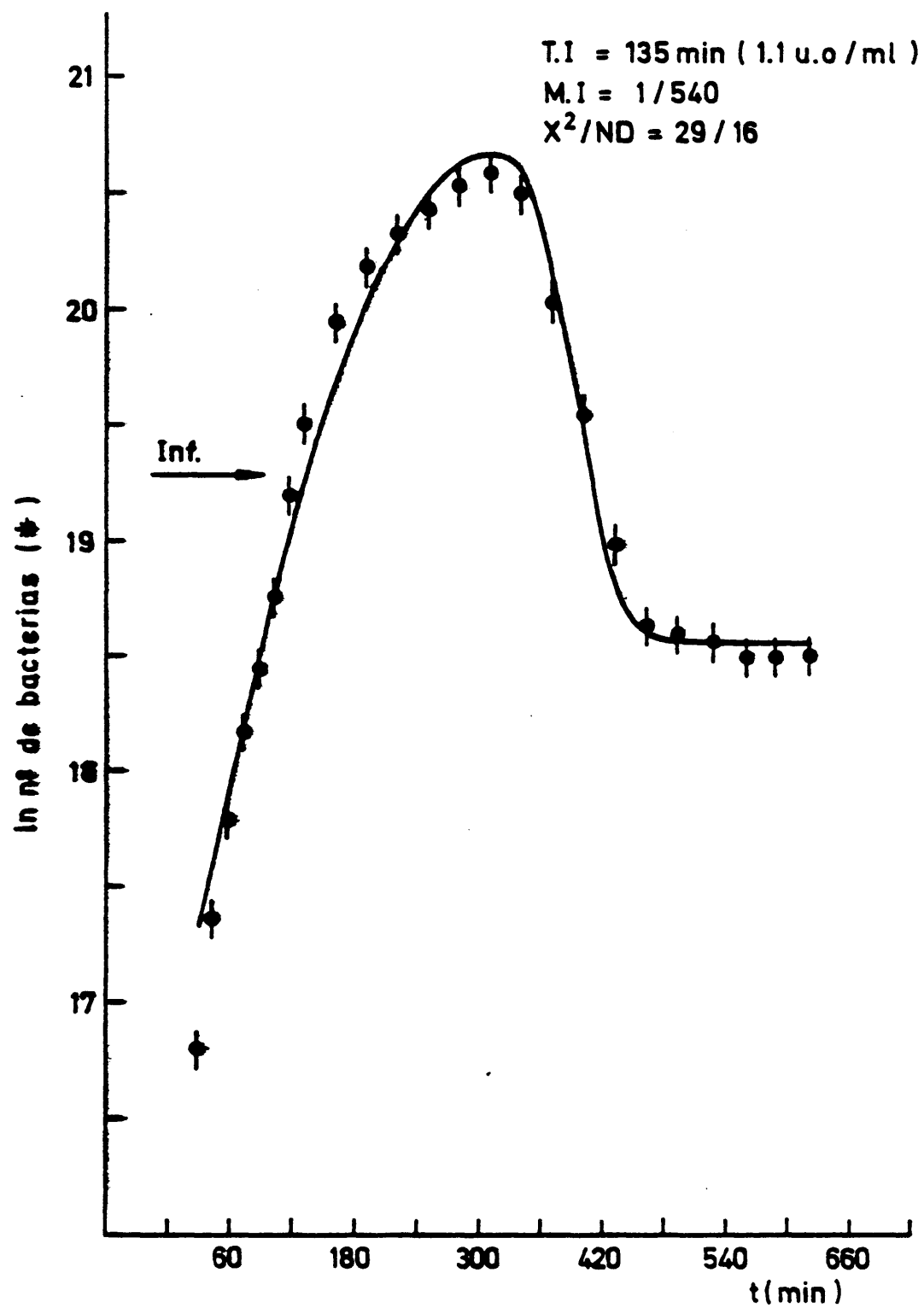


FIG V-15

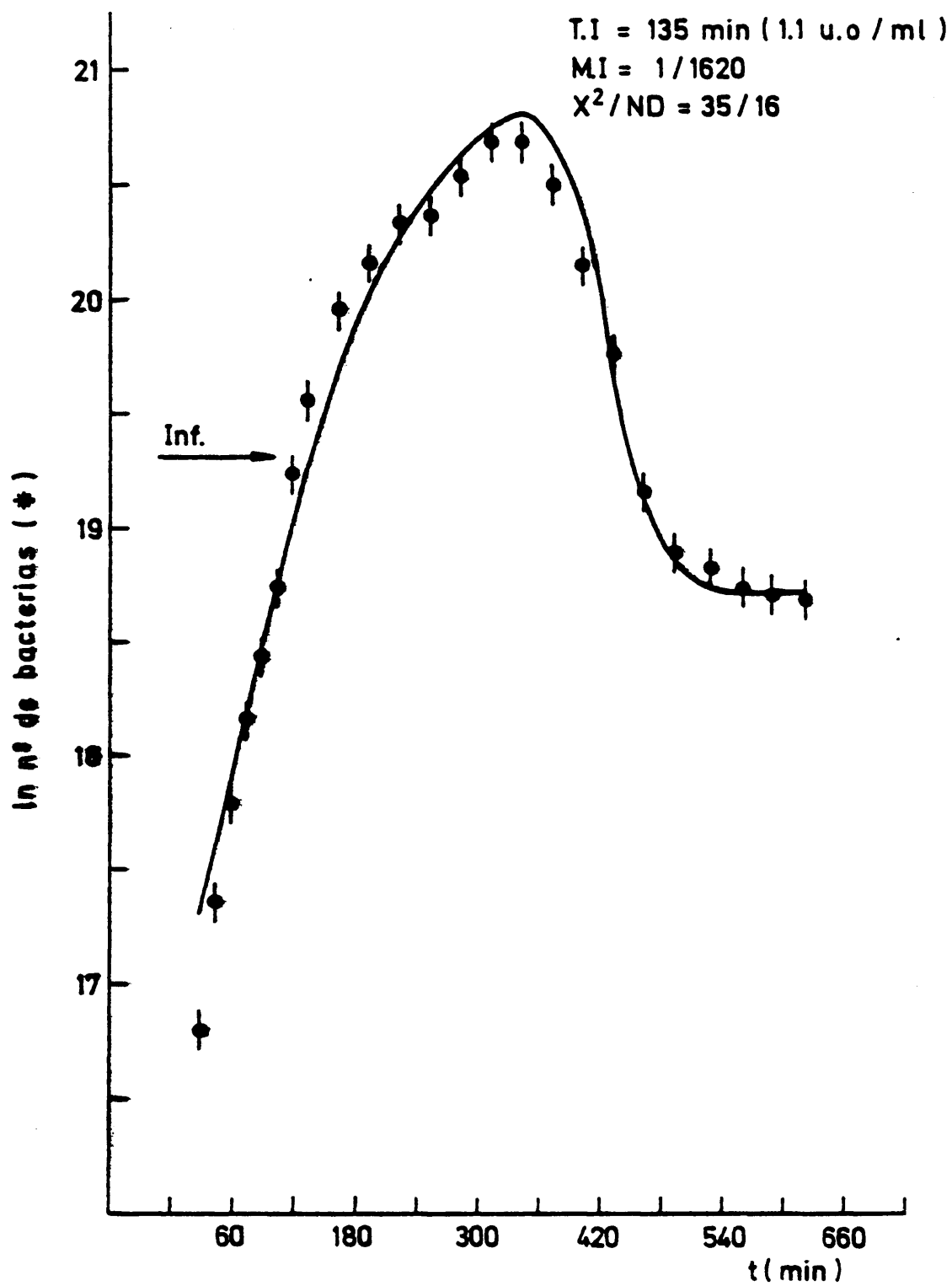


FIG. V - 16



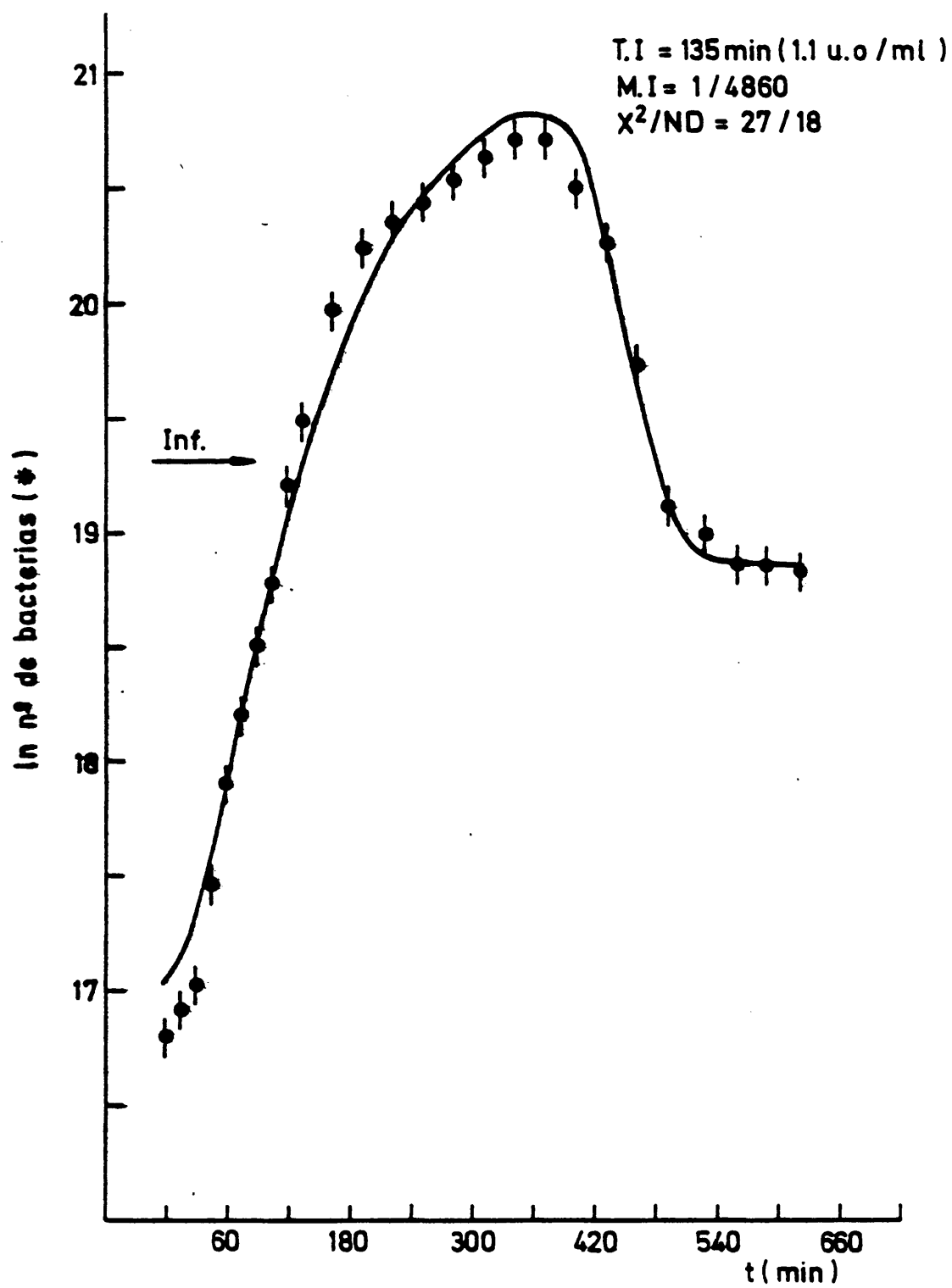


FIG. V - 17

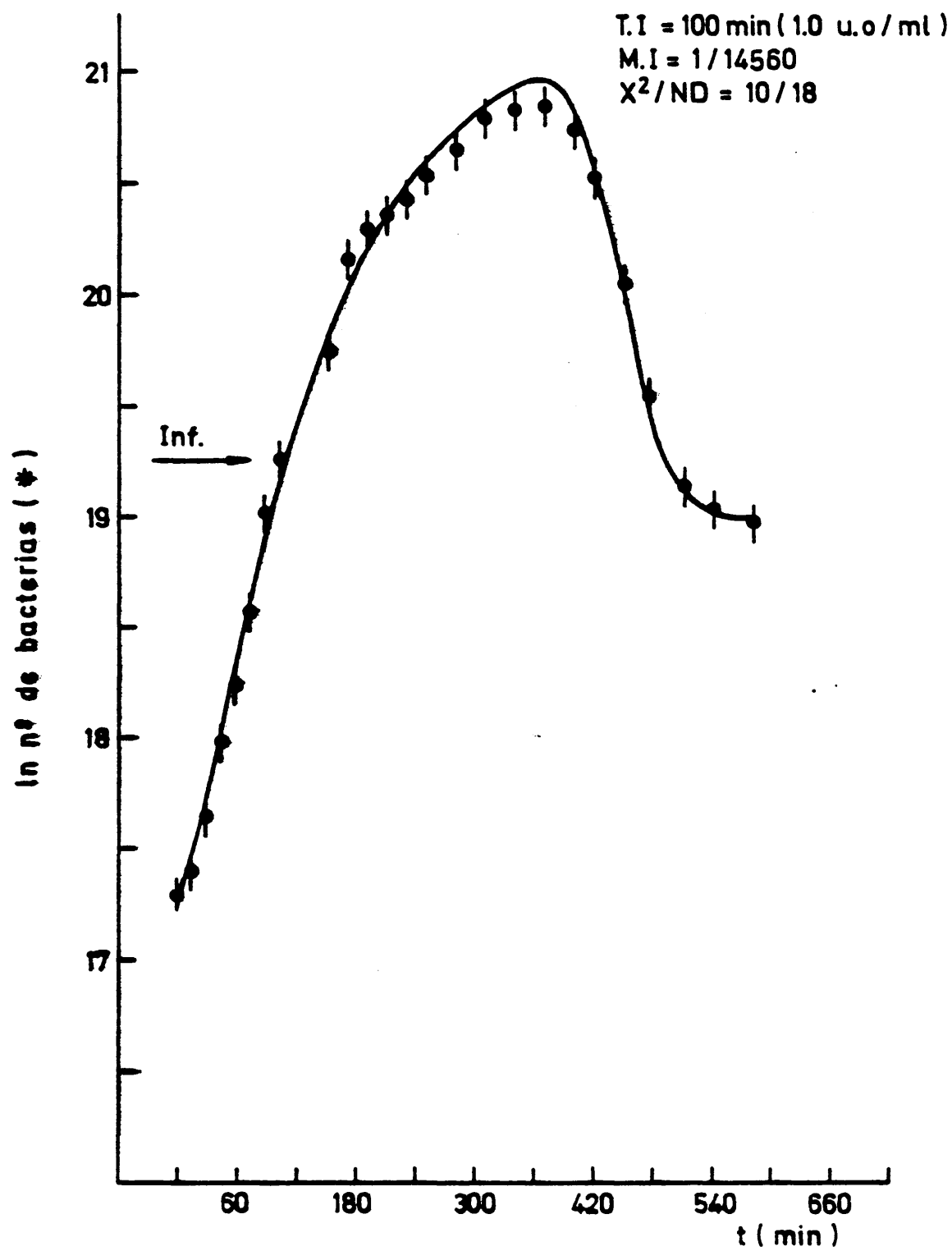


FIG. V - 18

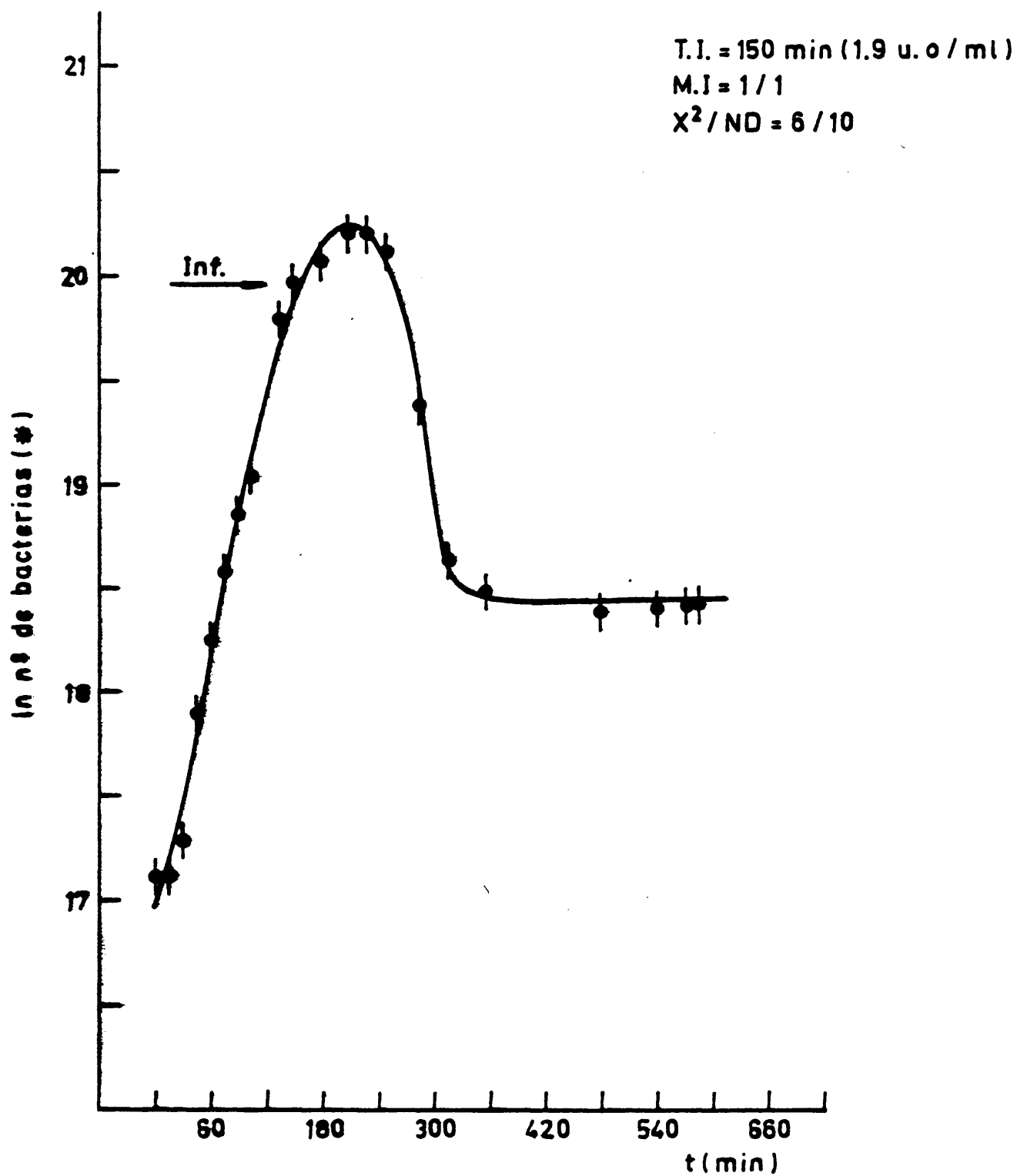


FIG. V-19

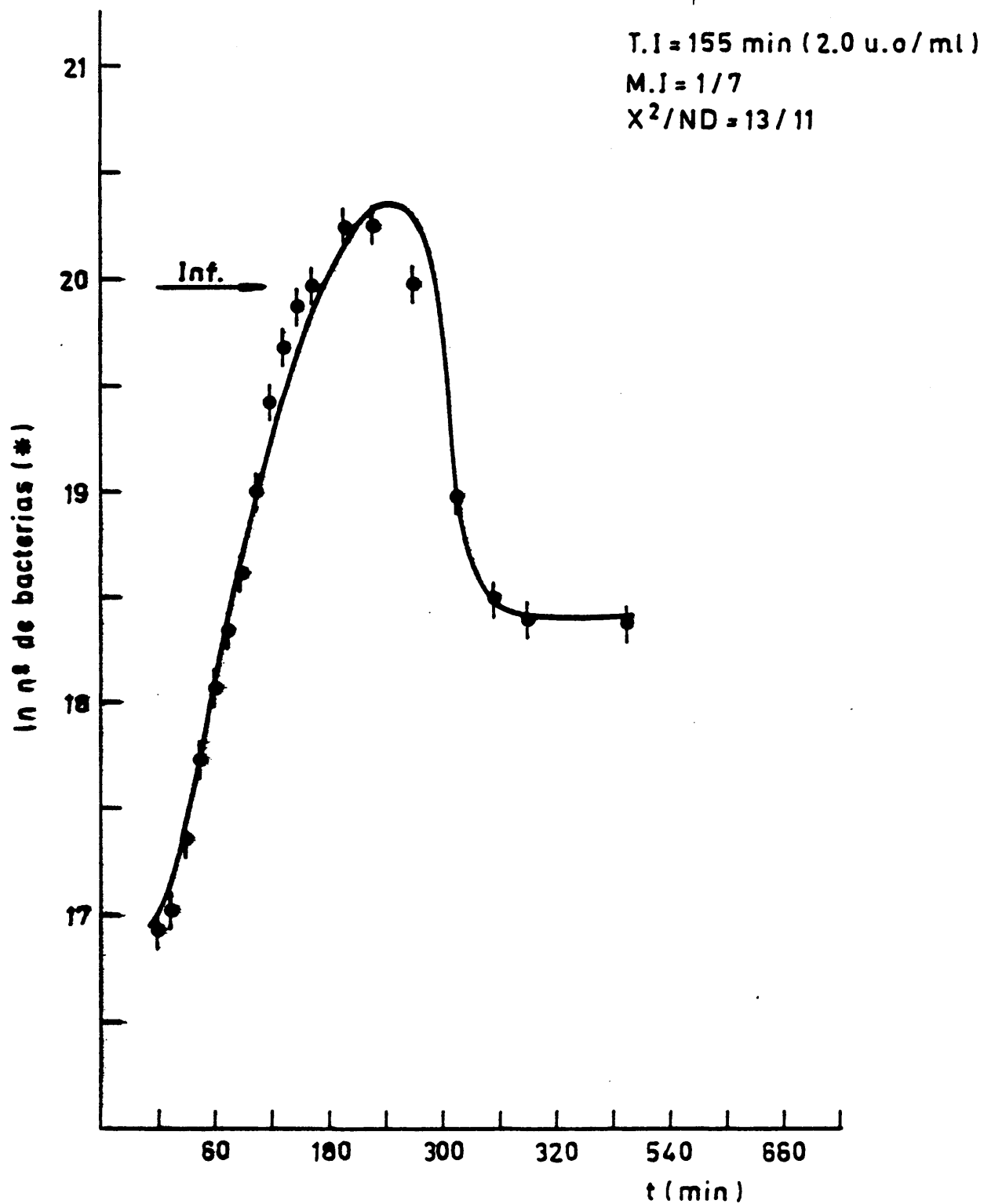


FIG. V-20

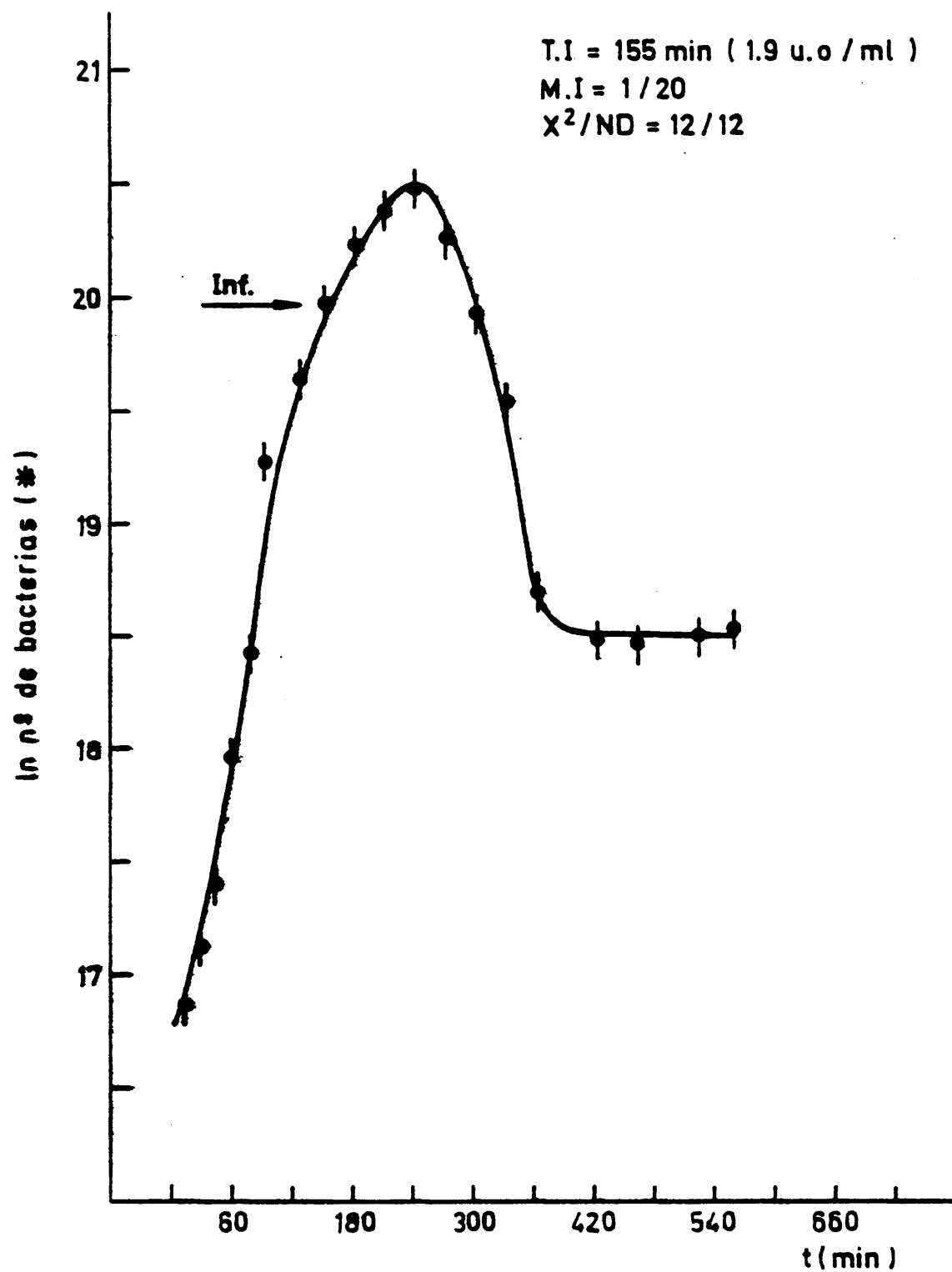


FIG. V-21

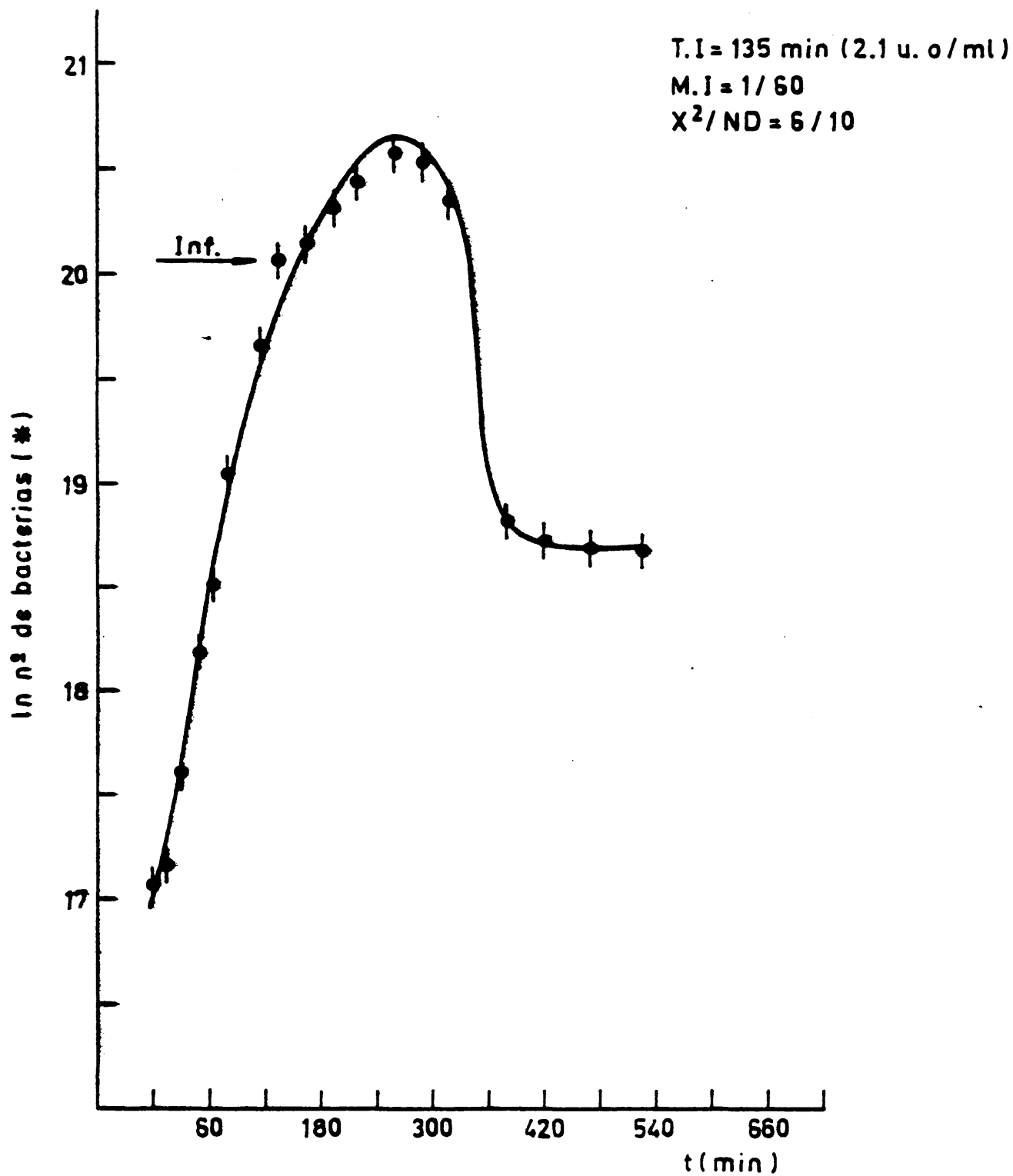


FIG. V - 22

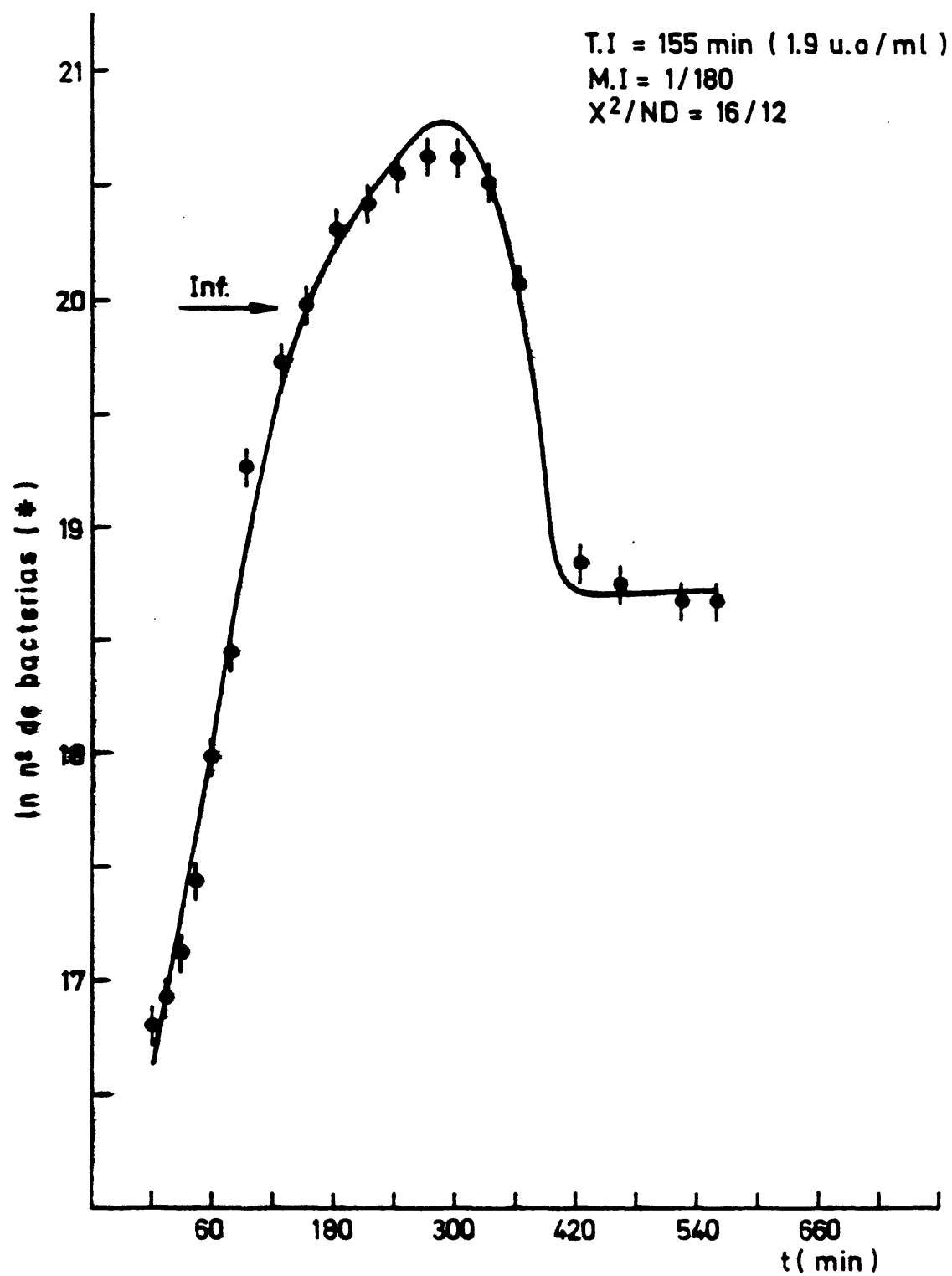


FIG. V - 23

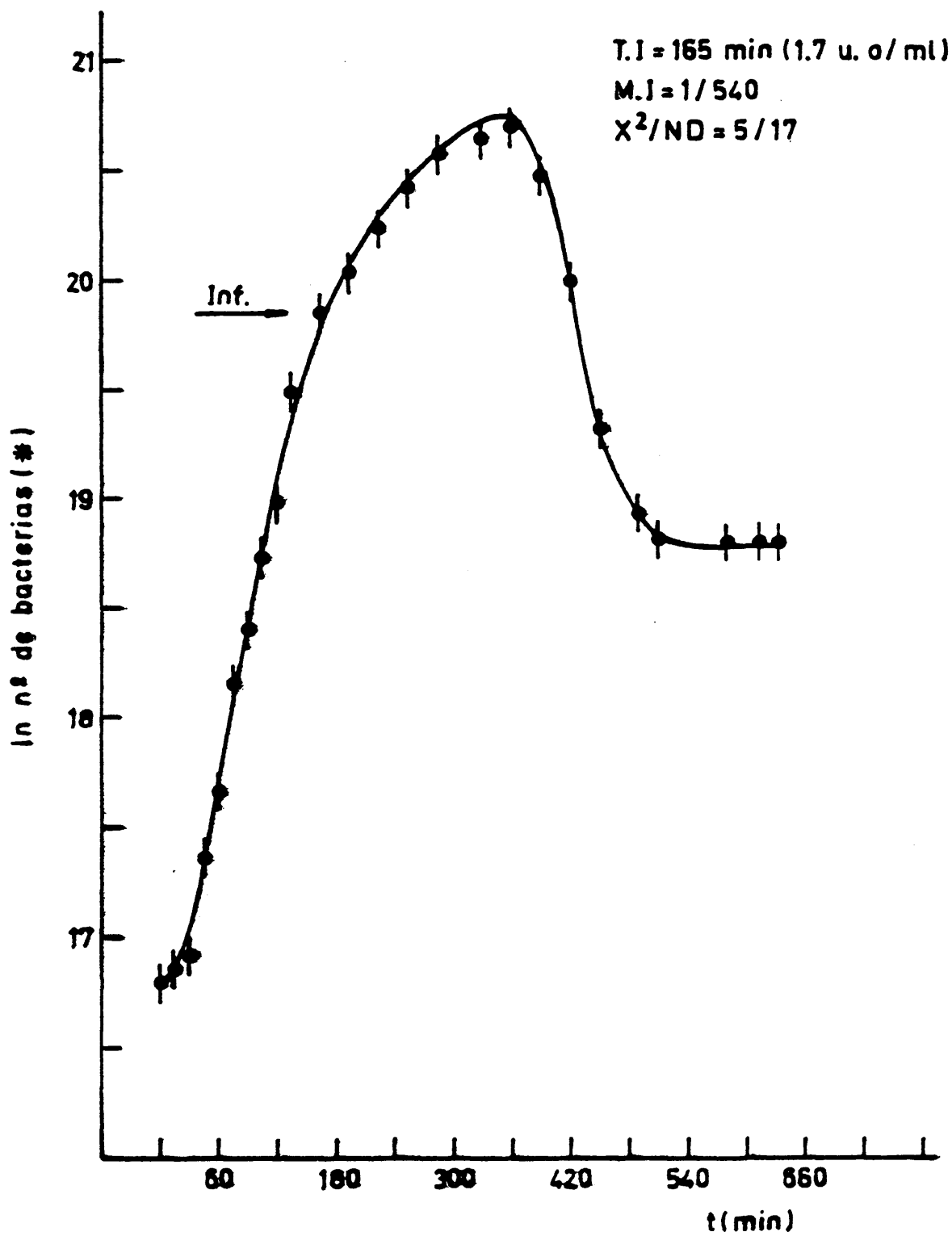


FIG. V-24



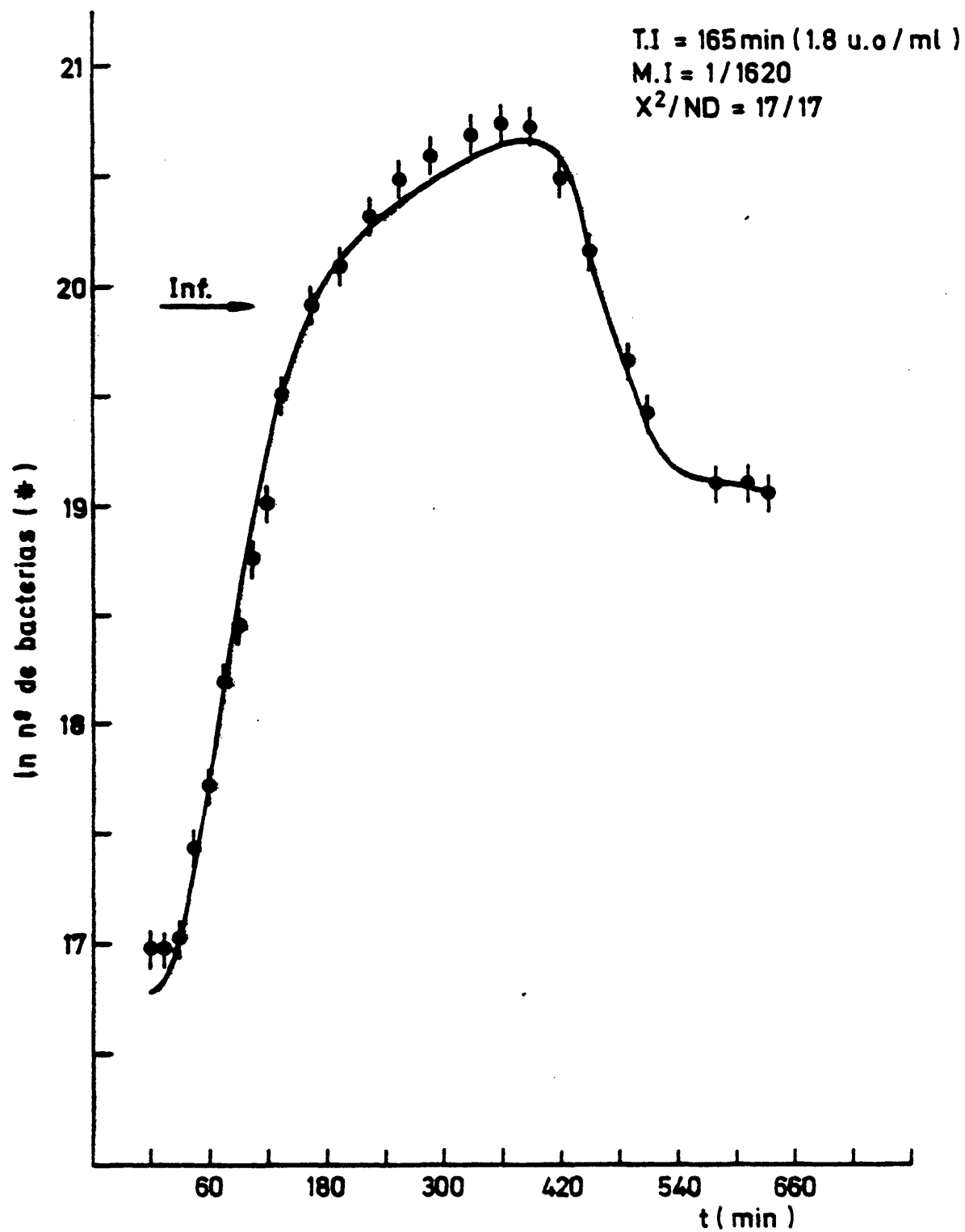


FIG. V - 25

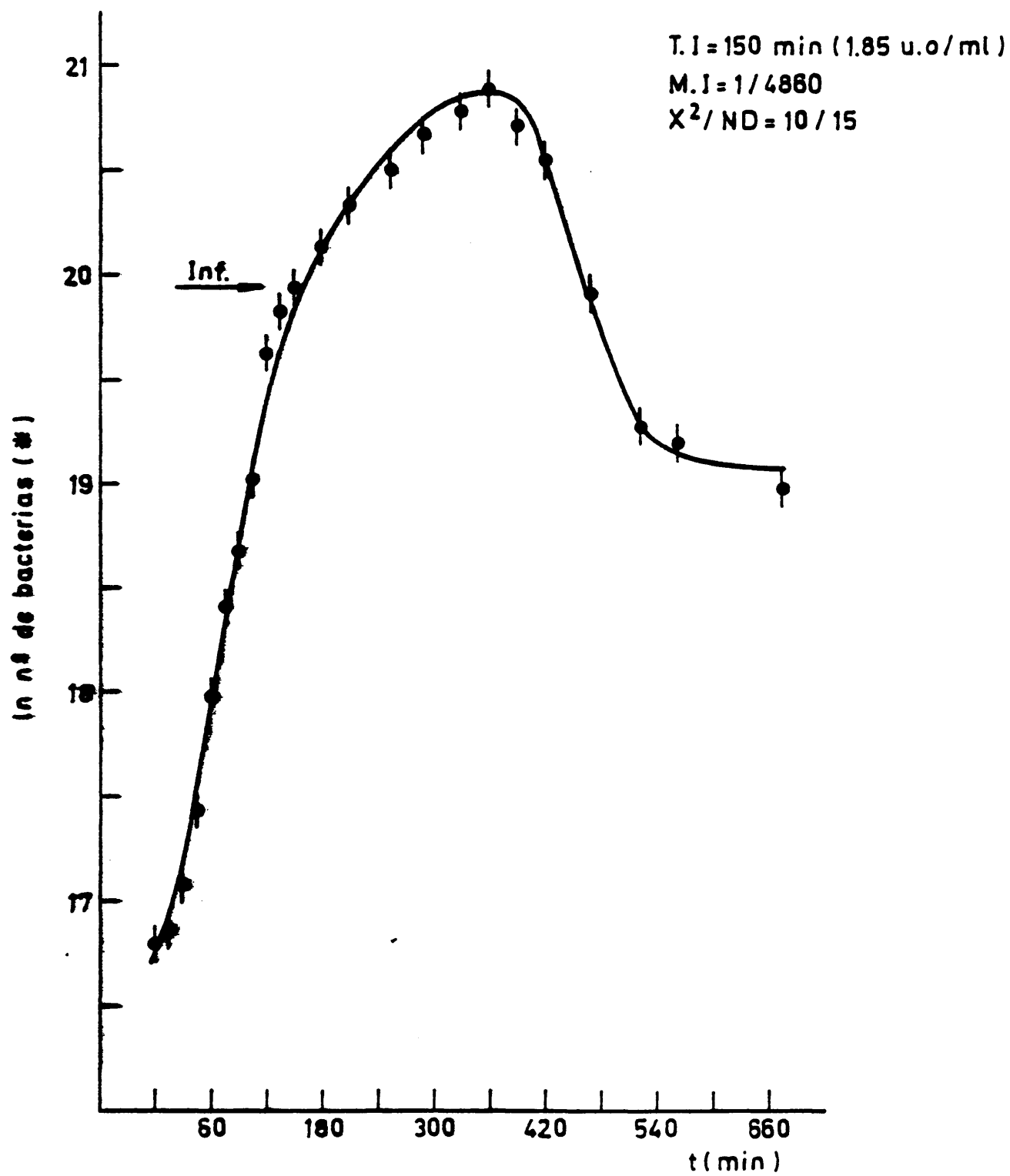


FIG. V - 26

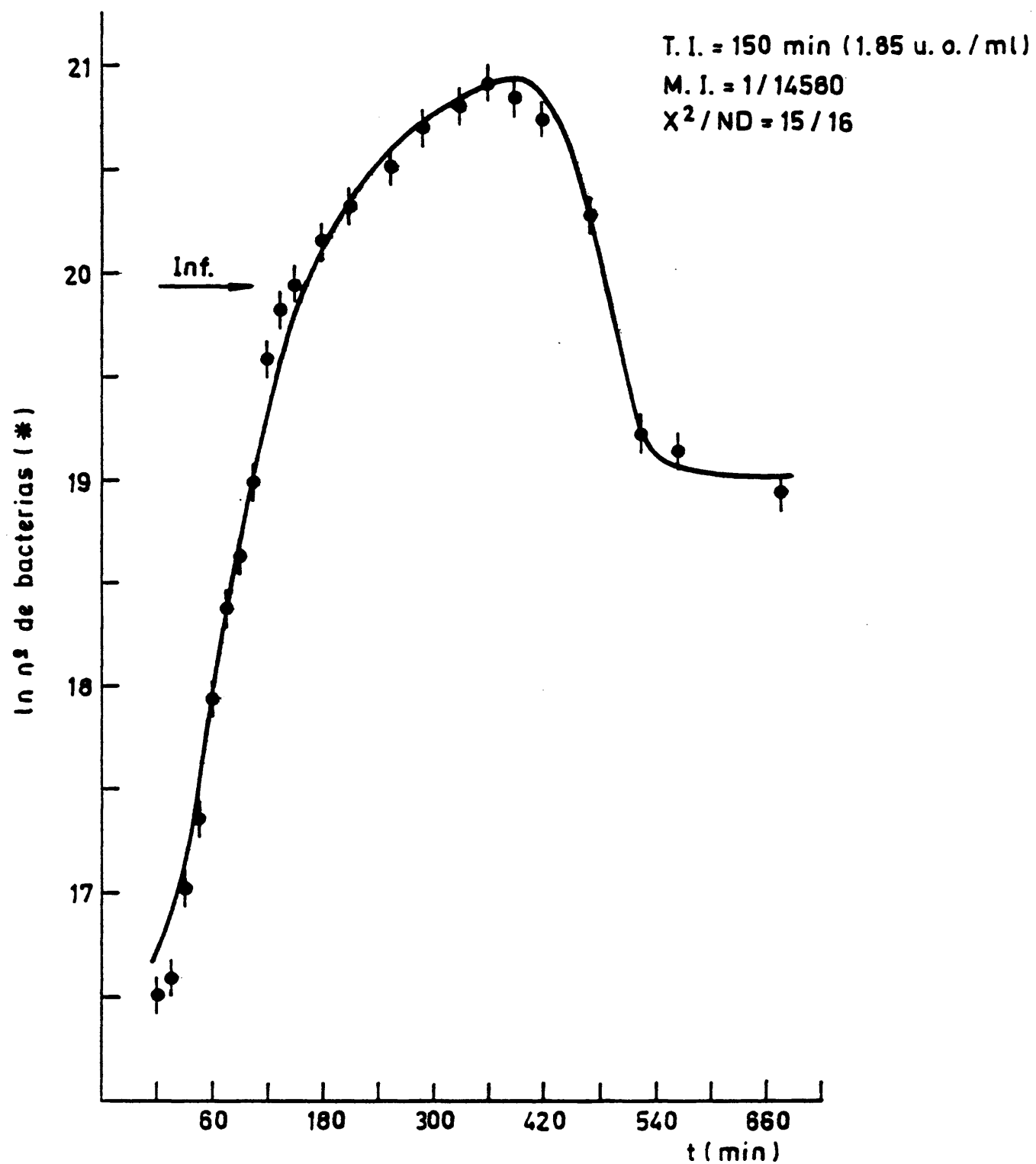


FIG. V - 27

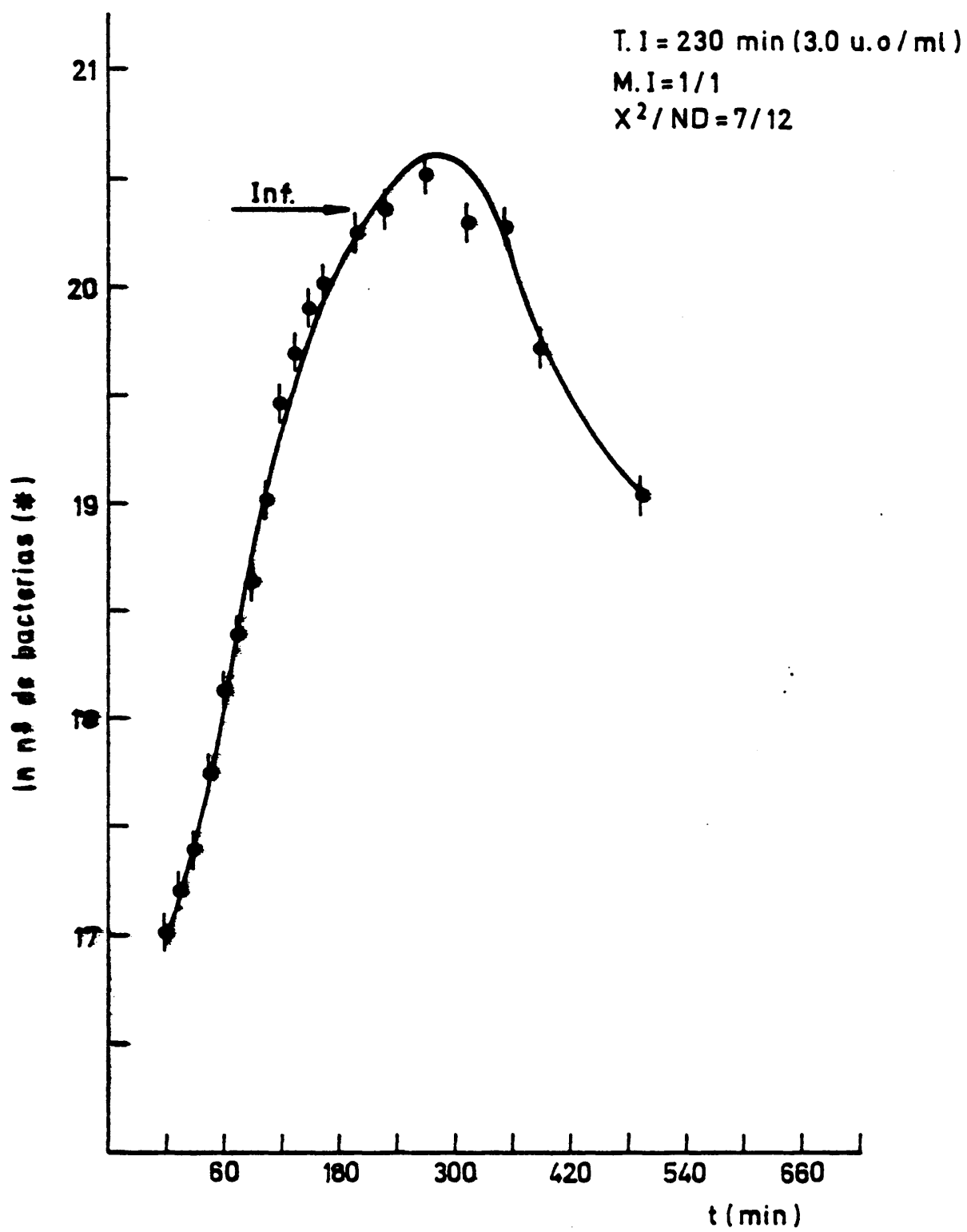


FIG. V - 28

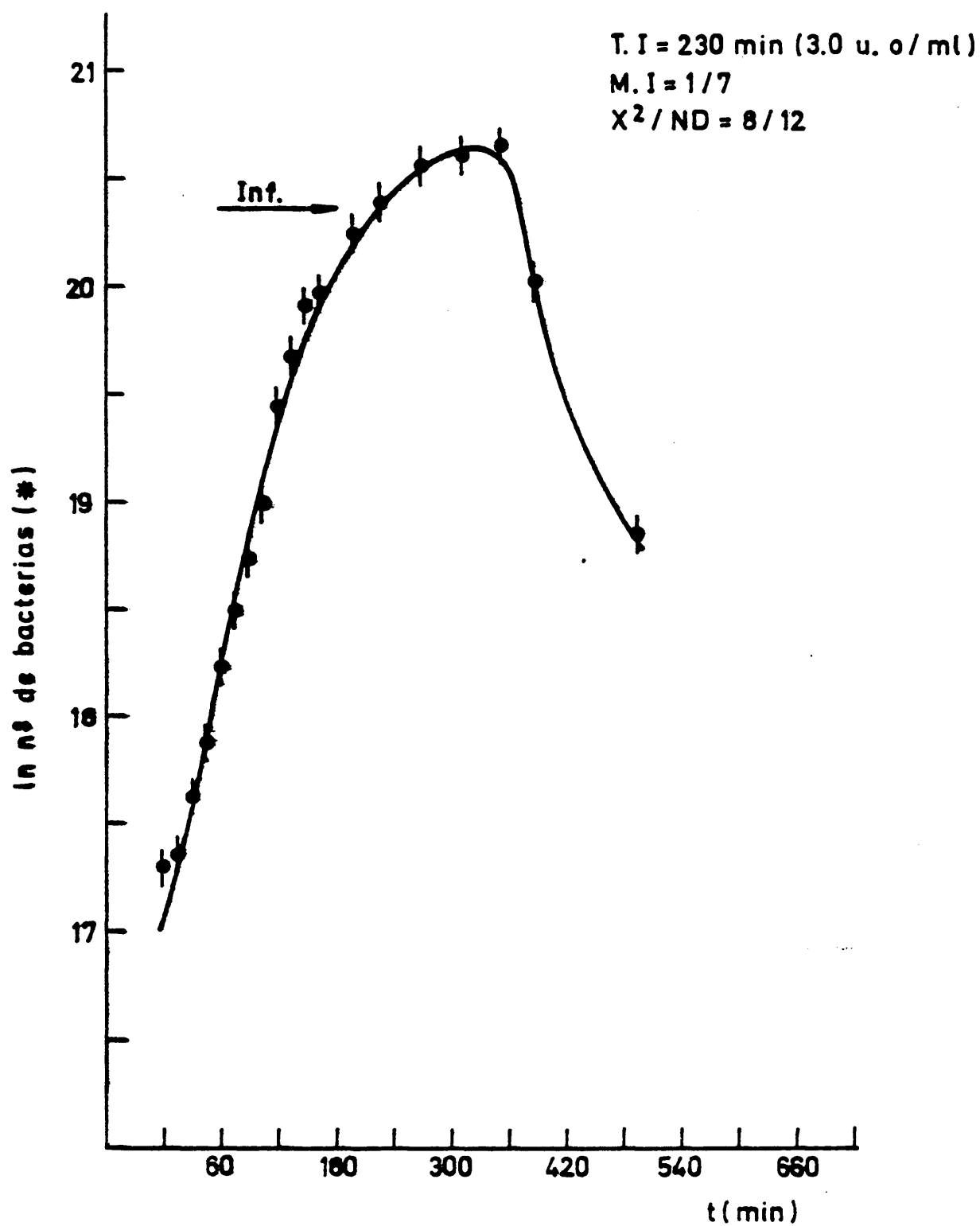


FIG. V-29

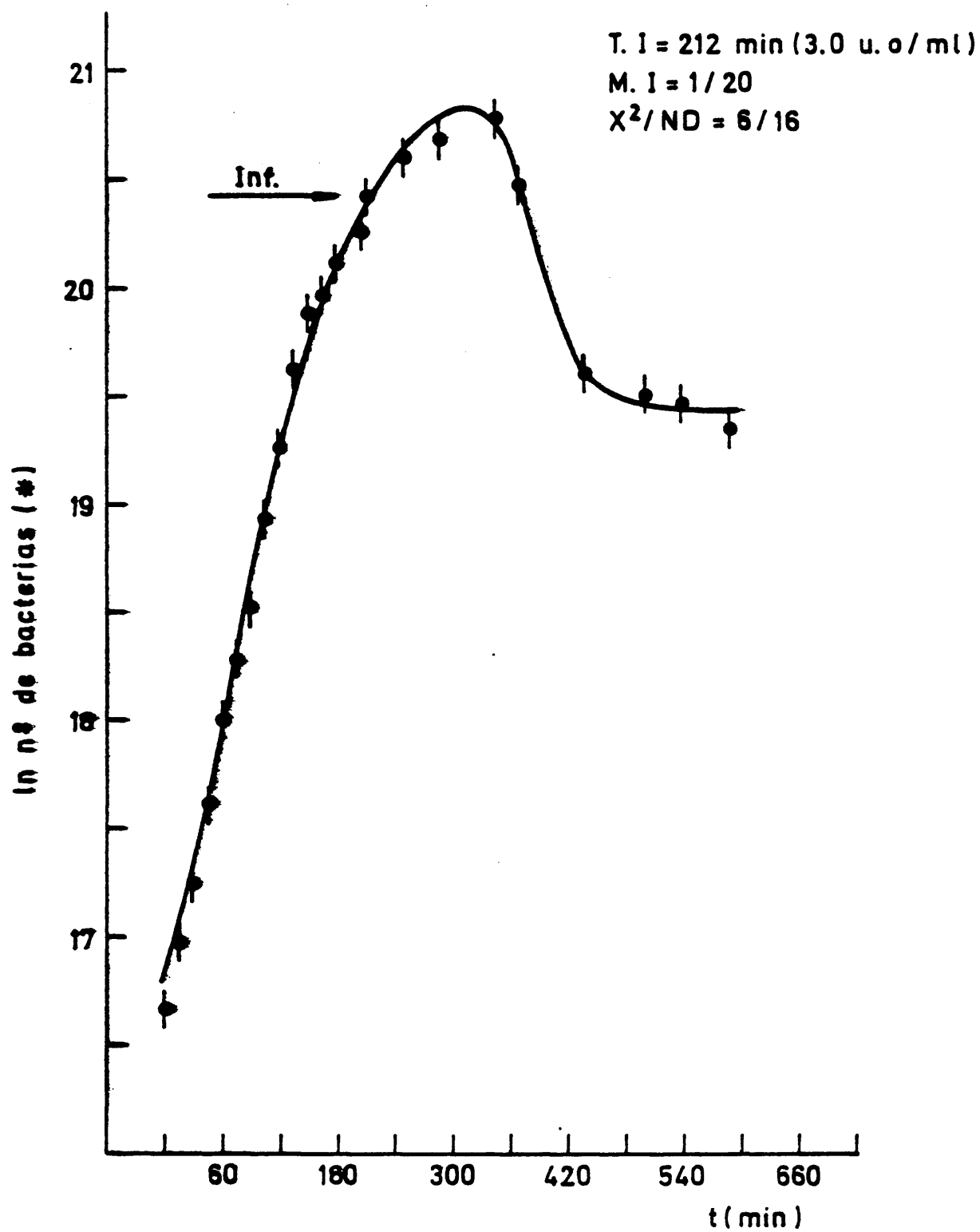


FIG. V - 30

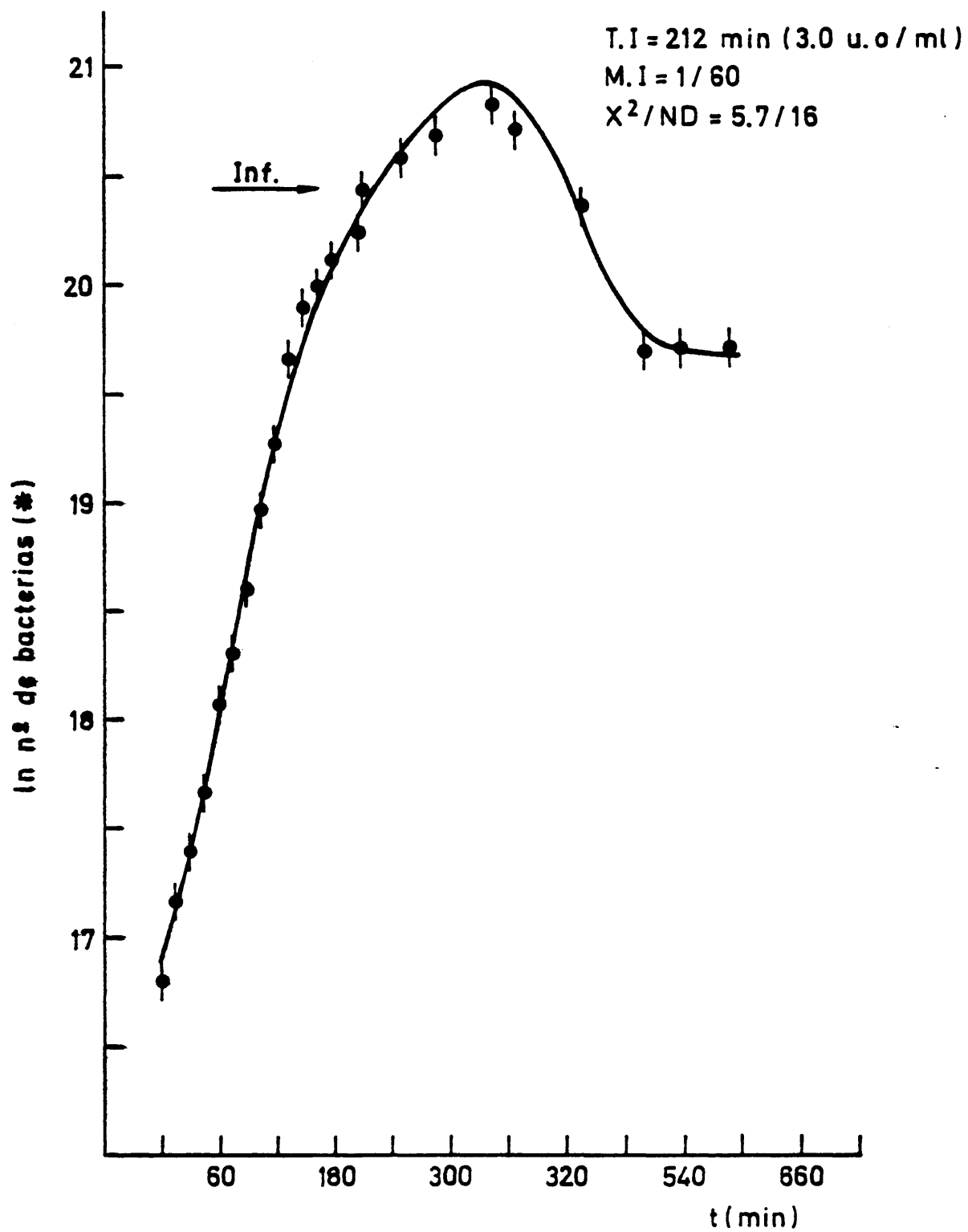


FIG. V-31

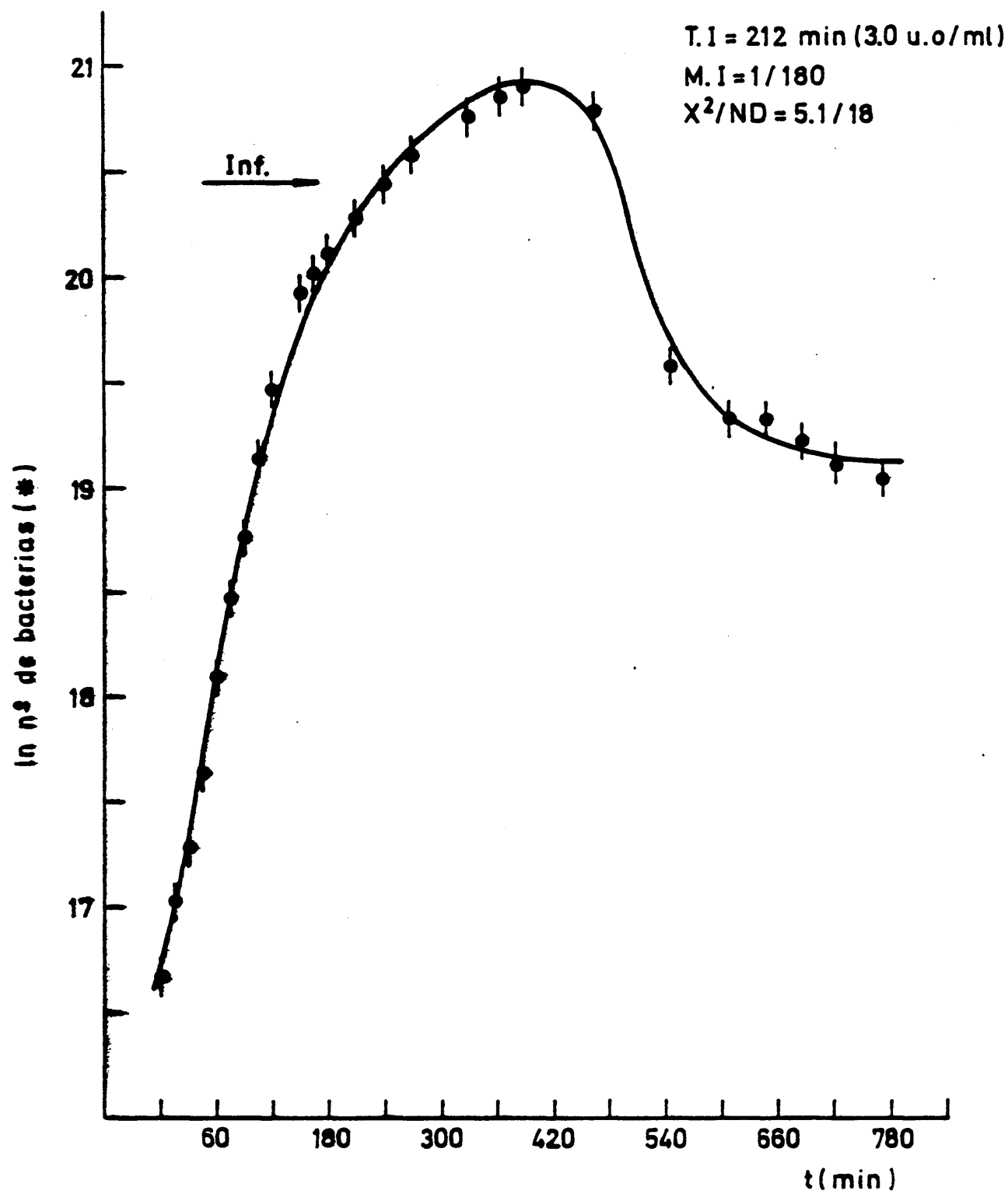


FIG. V - 32



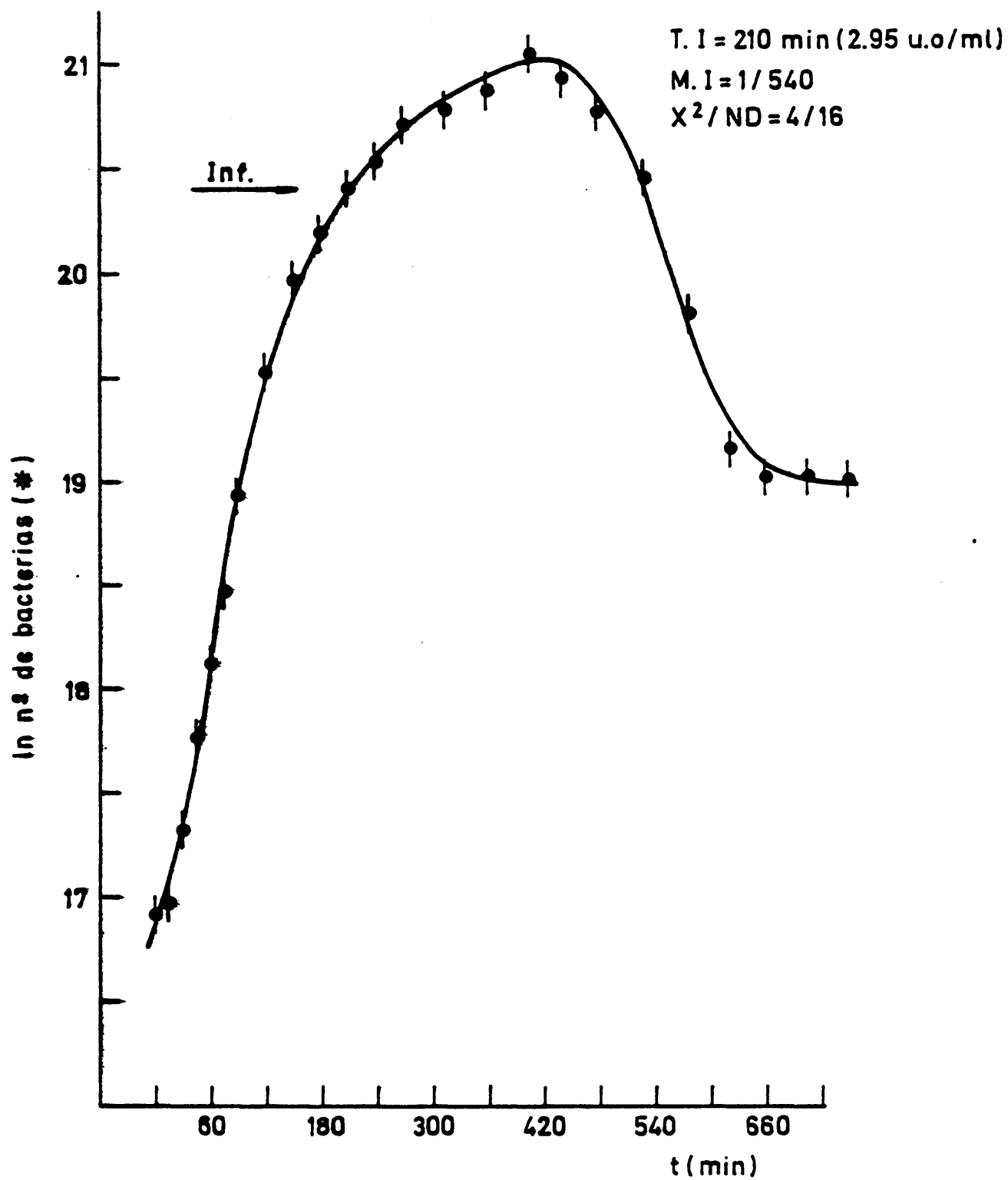


FIG. V - 33

T.I = 240 min (3.1 u. o/ml)

M.I = 1/1620

$\chi^2/ND = 9.4/18$

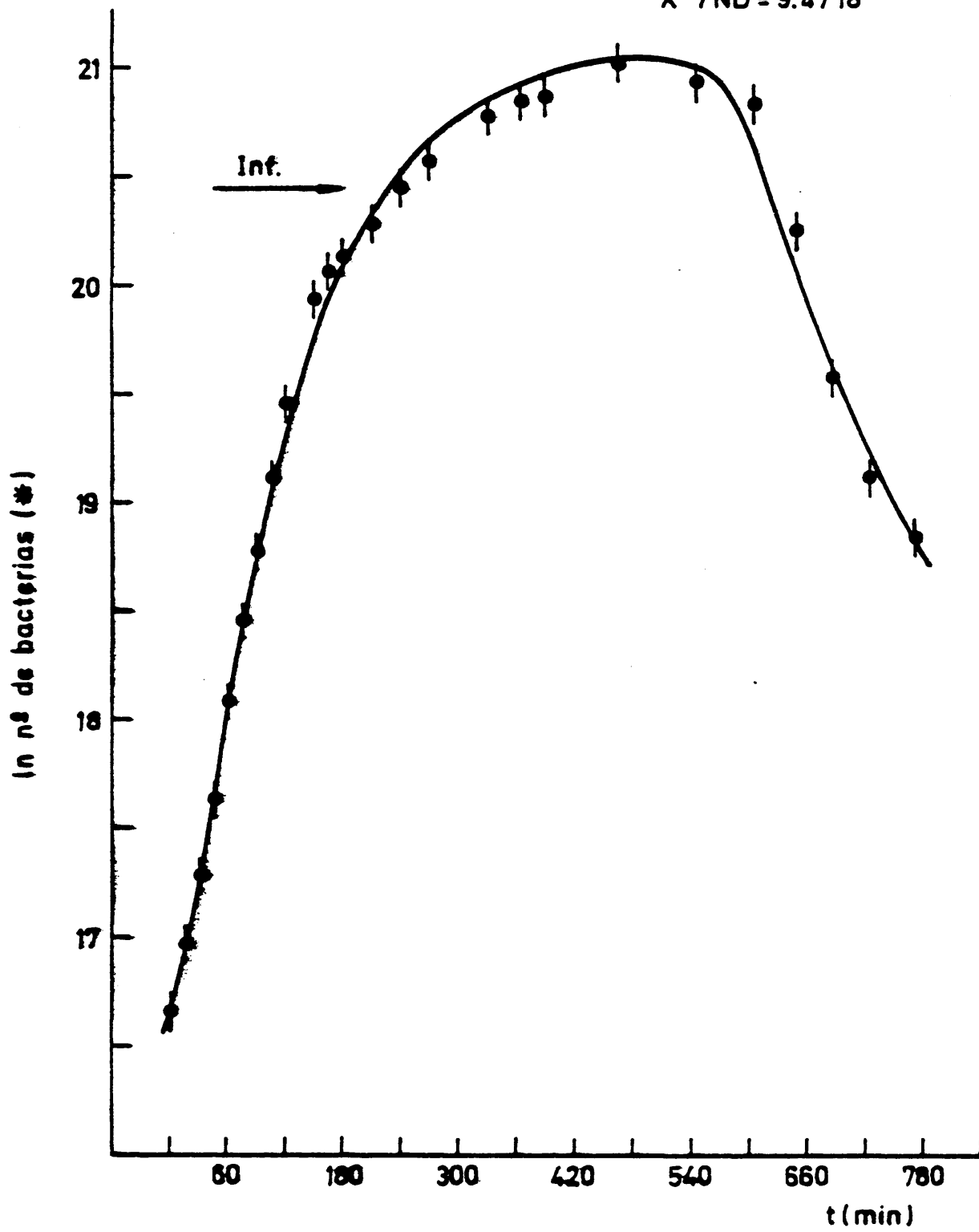


FIG. V-34

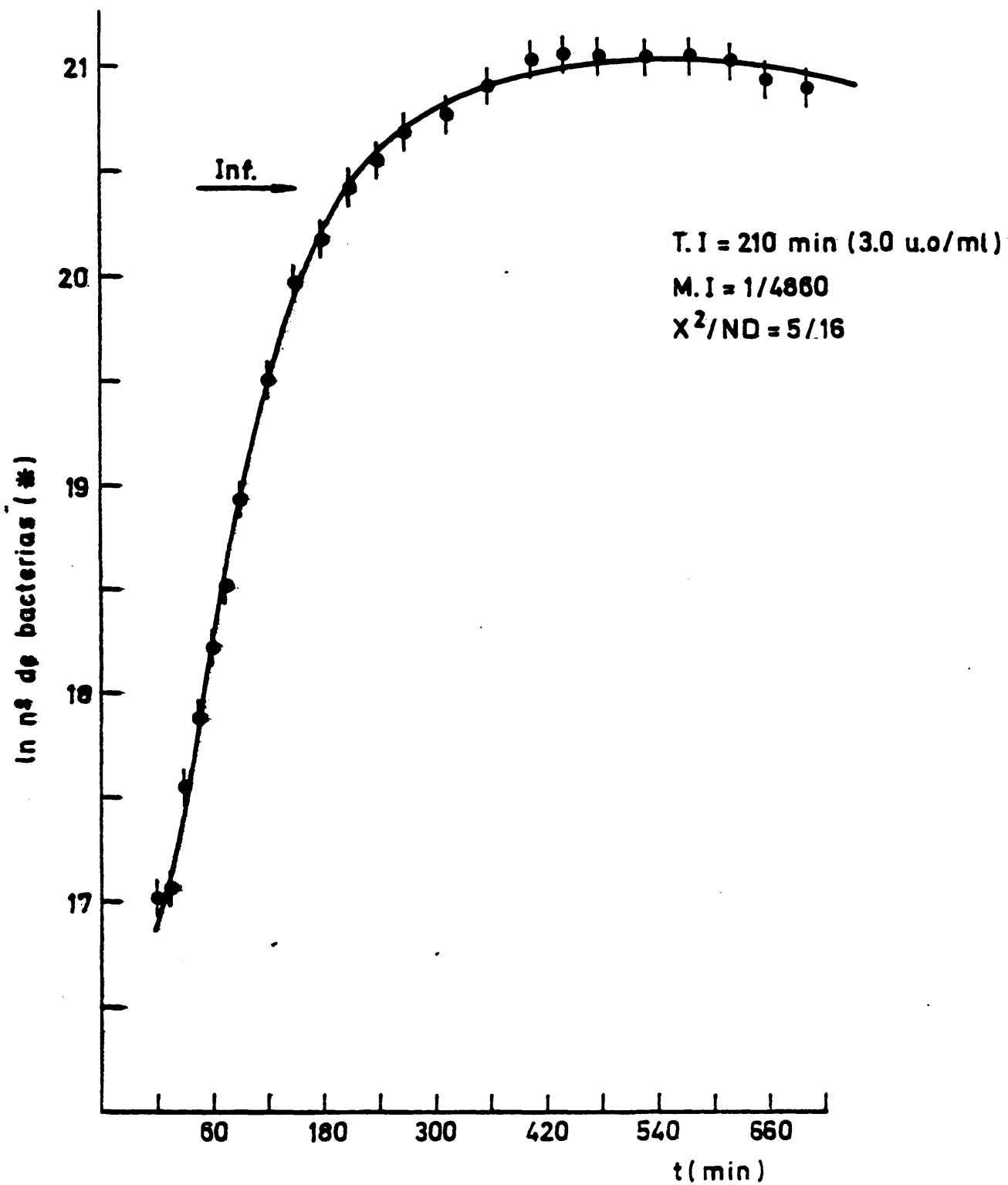


FIG. V-35

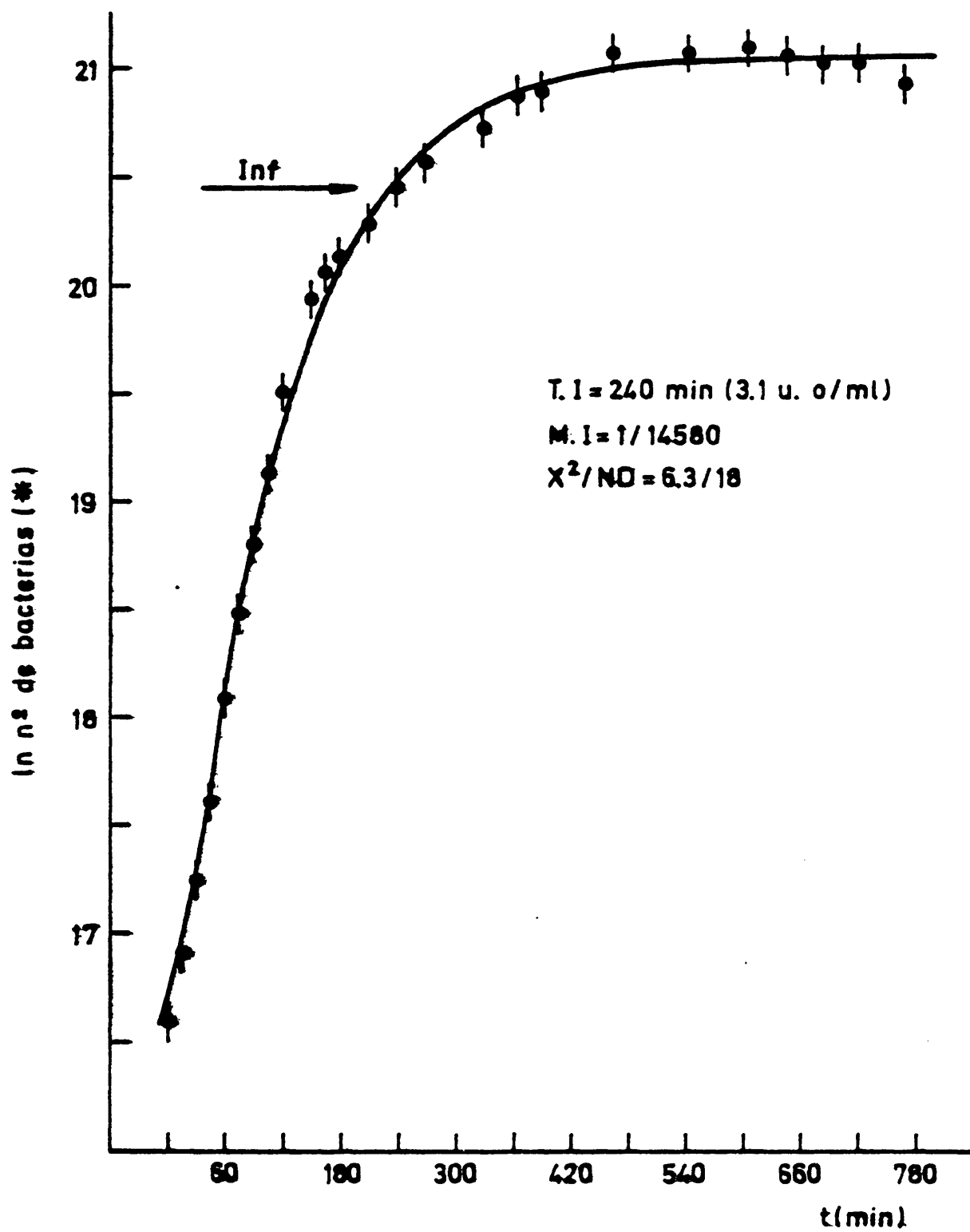


FIG. V-36

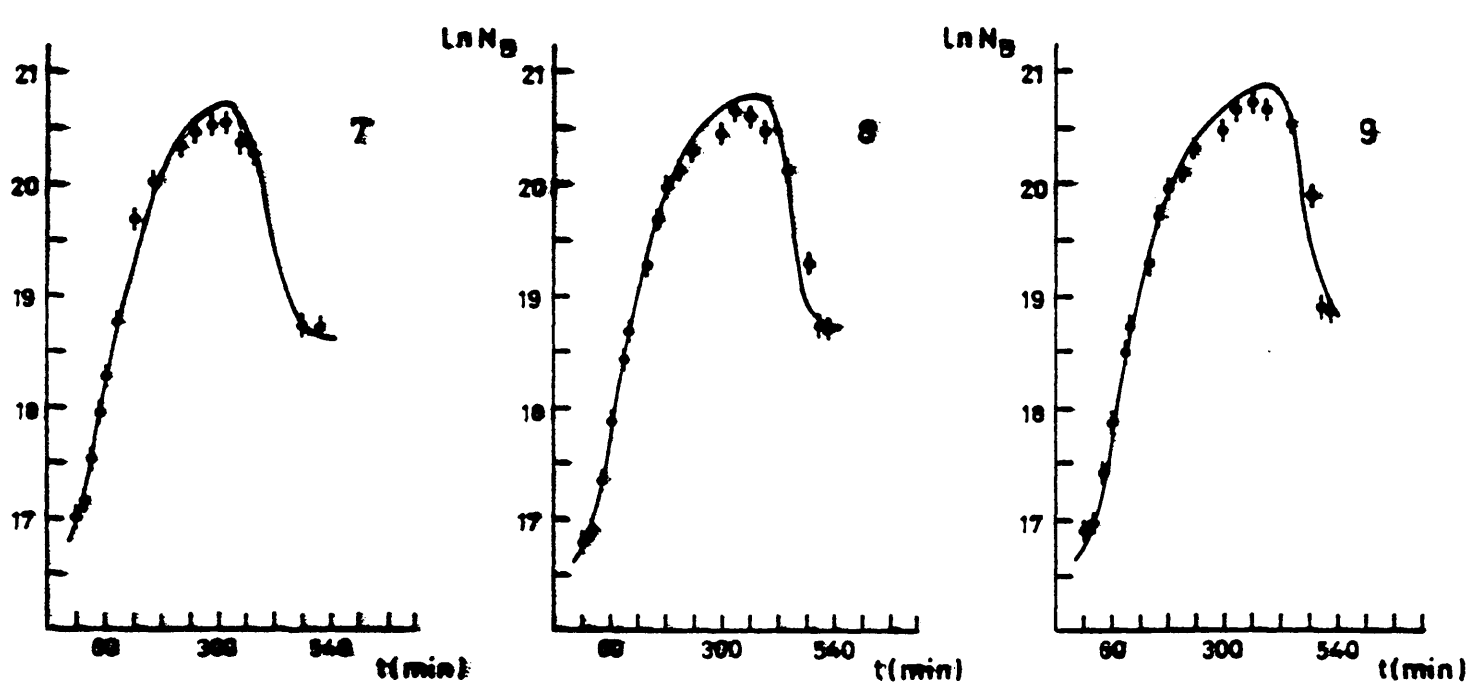
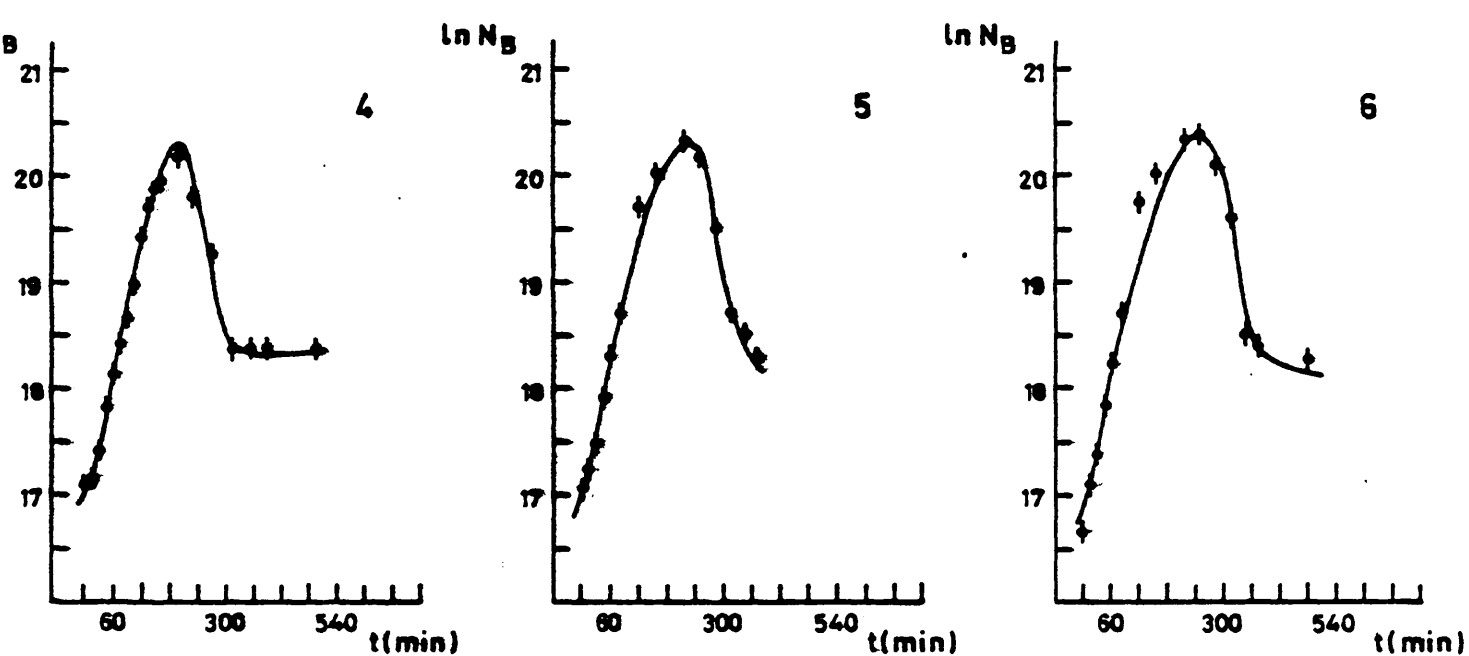
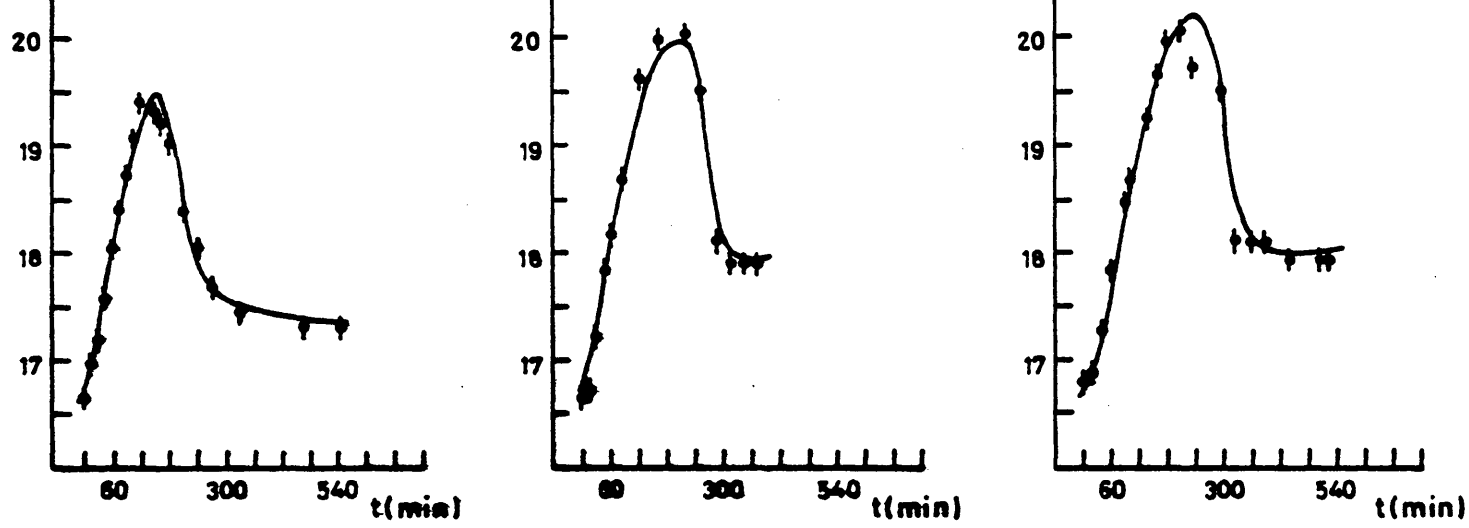


FIG. V - 37

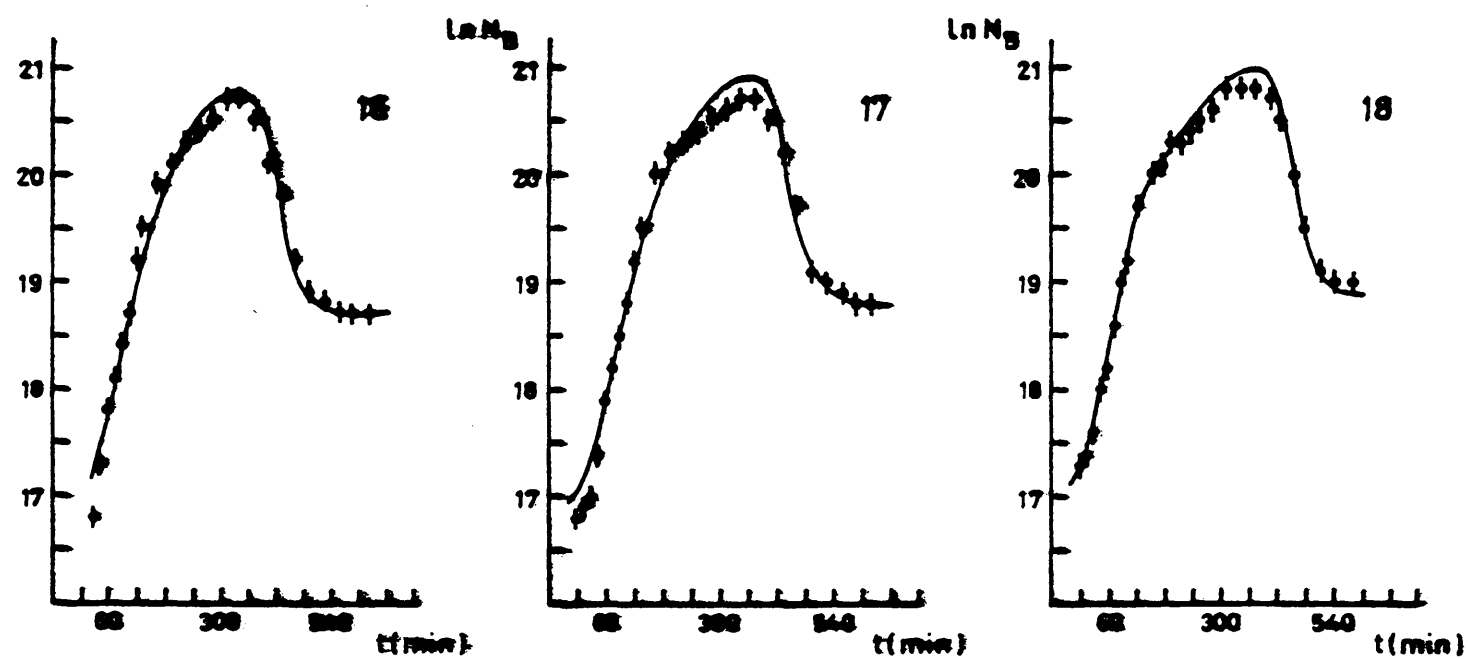
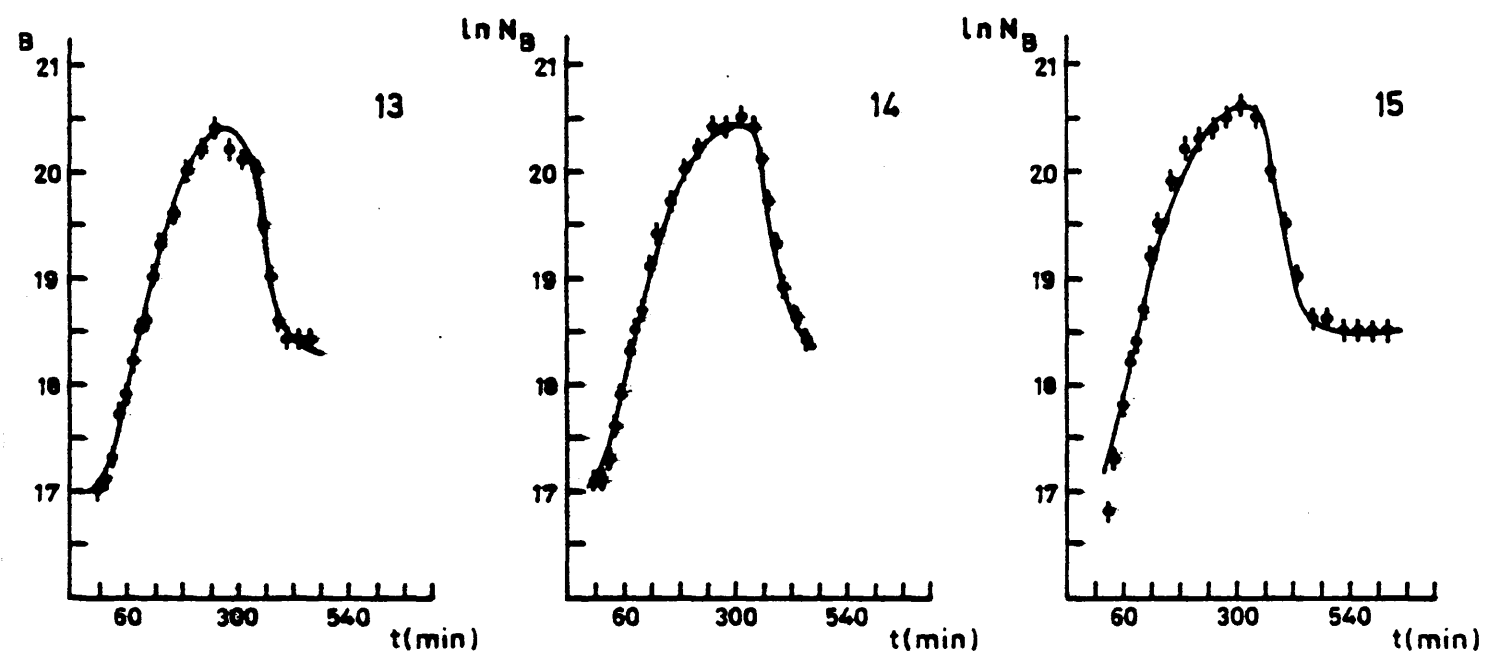
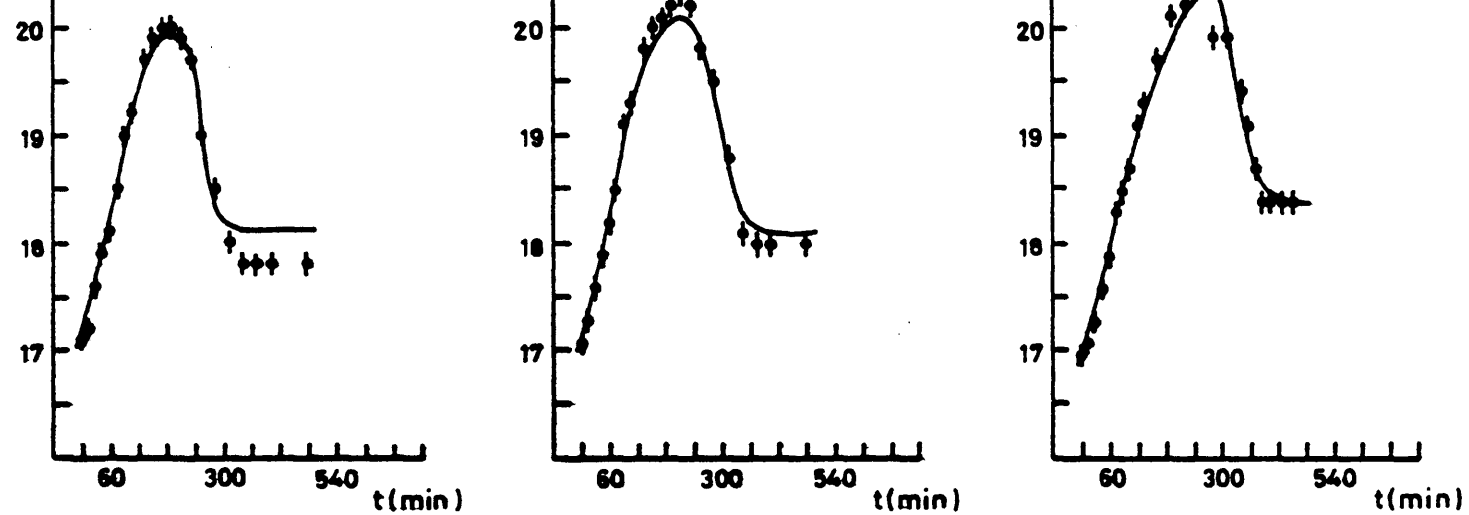


FIG V-38

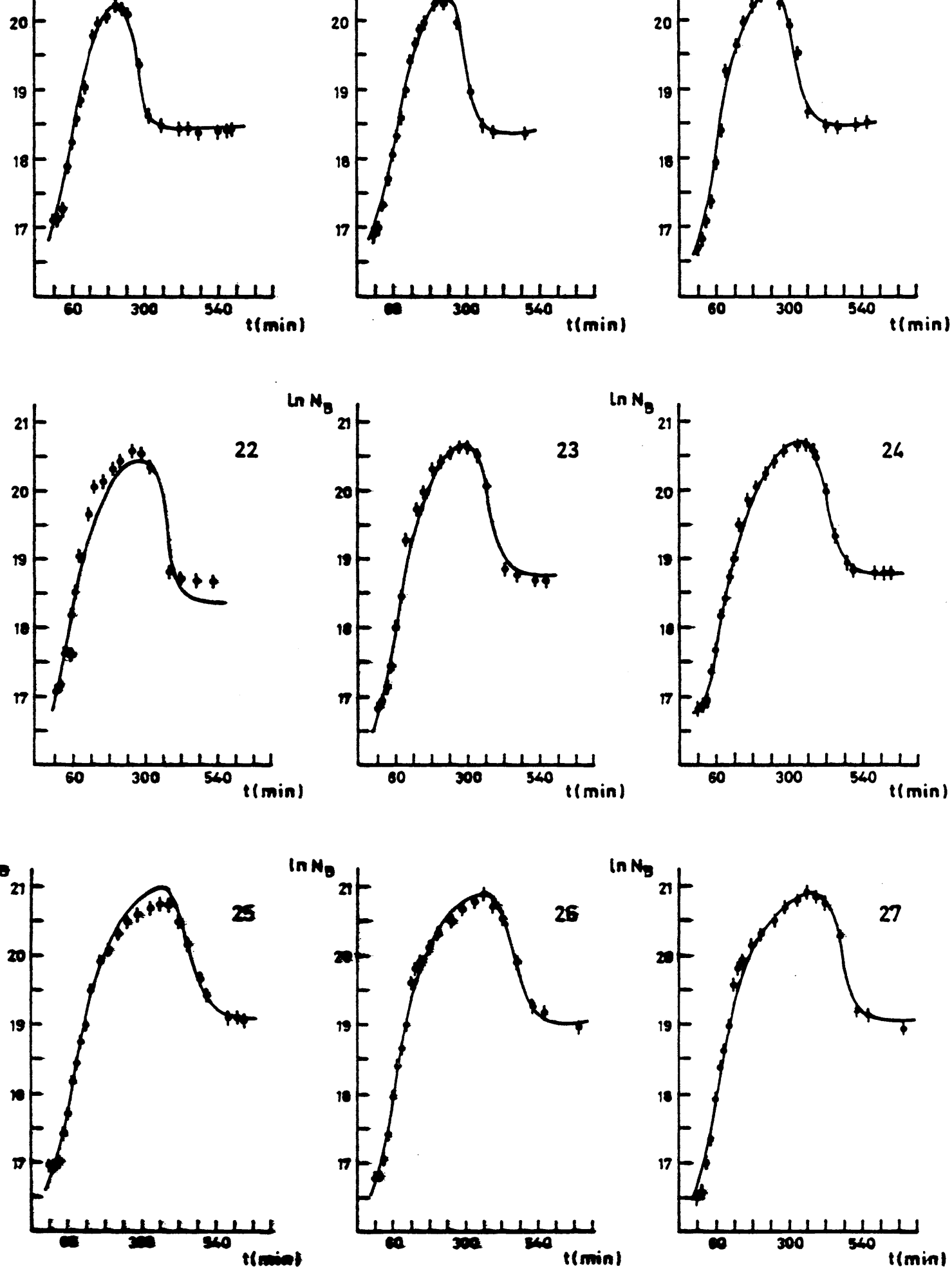
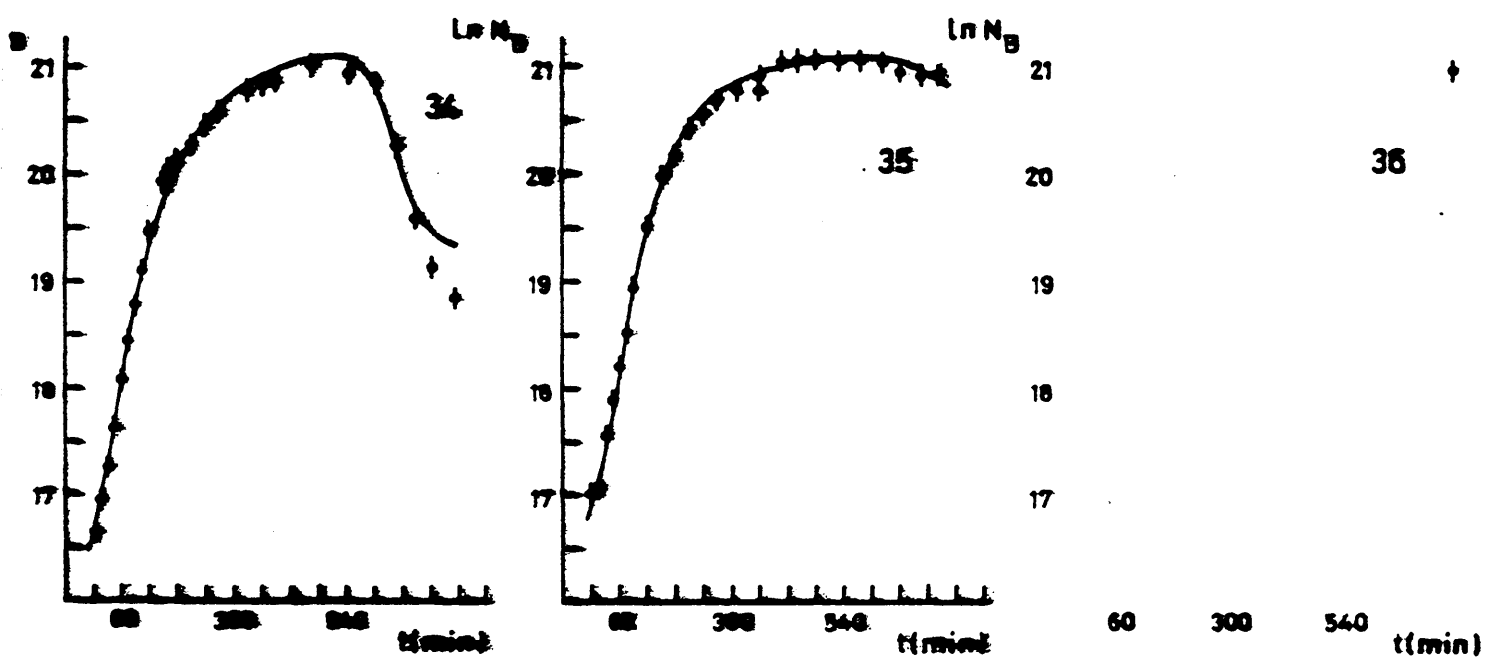
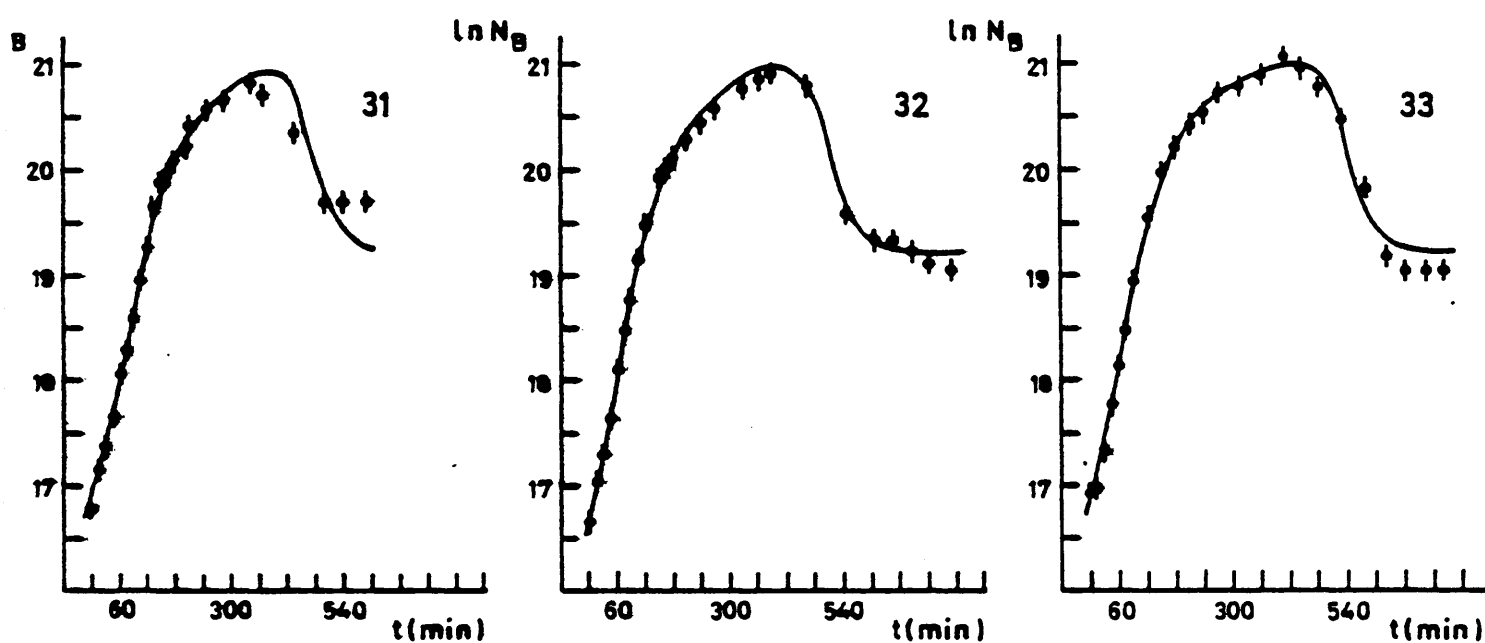
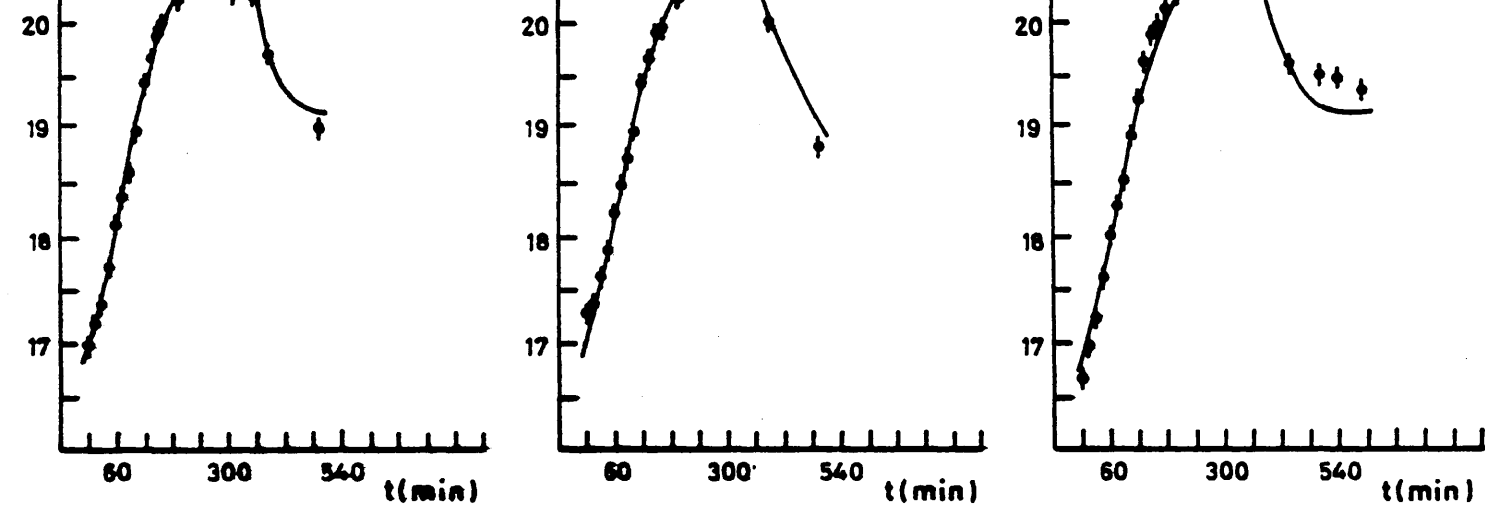


FIG. V-39





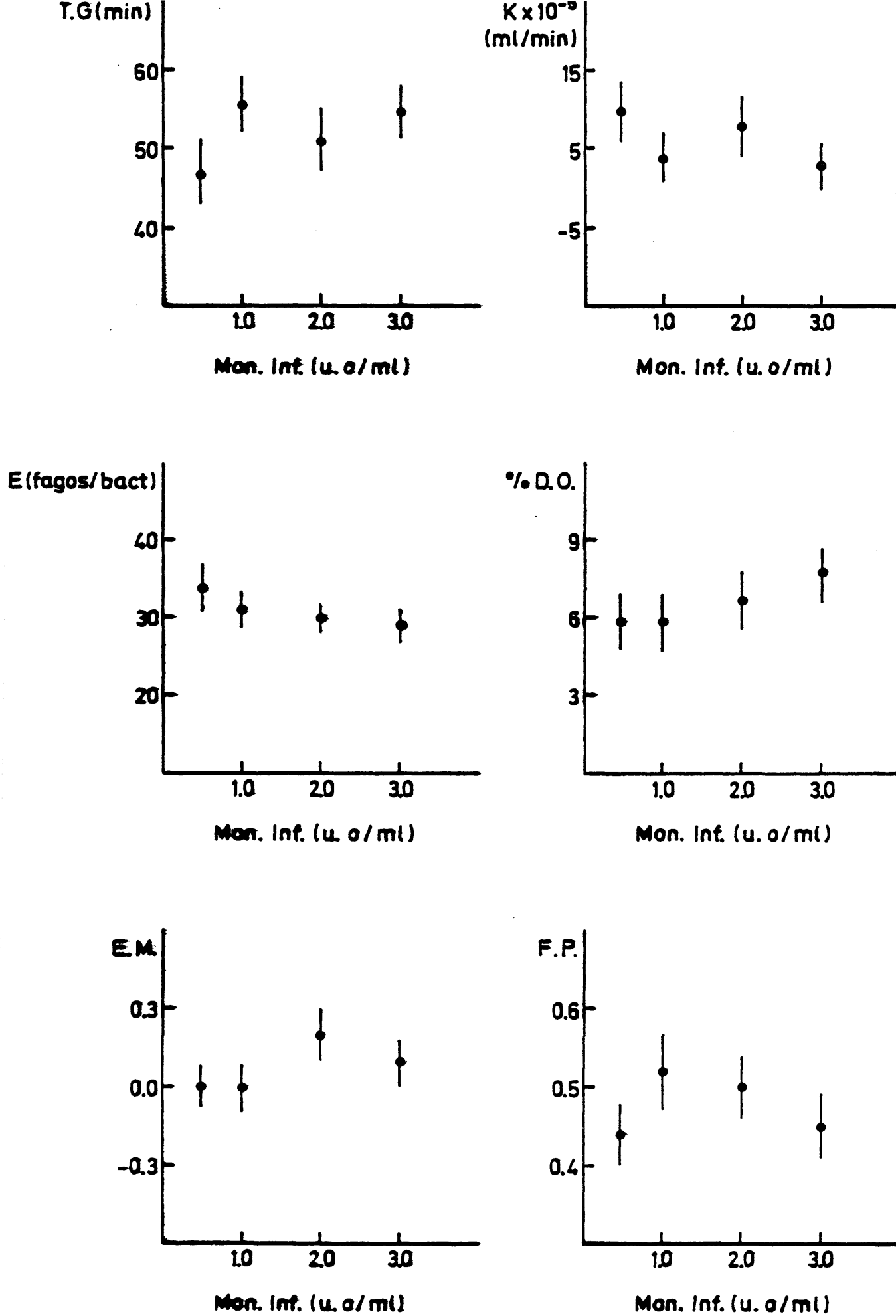


FIG. V-41

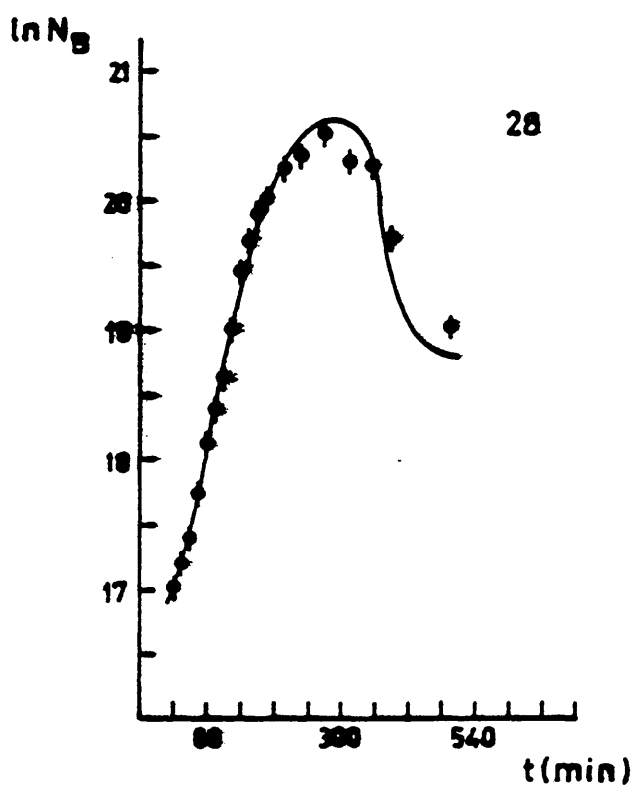
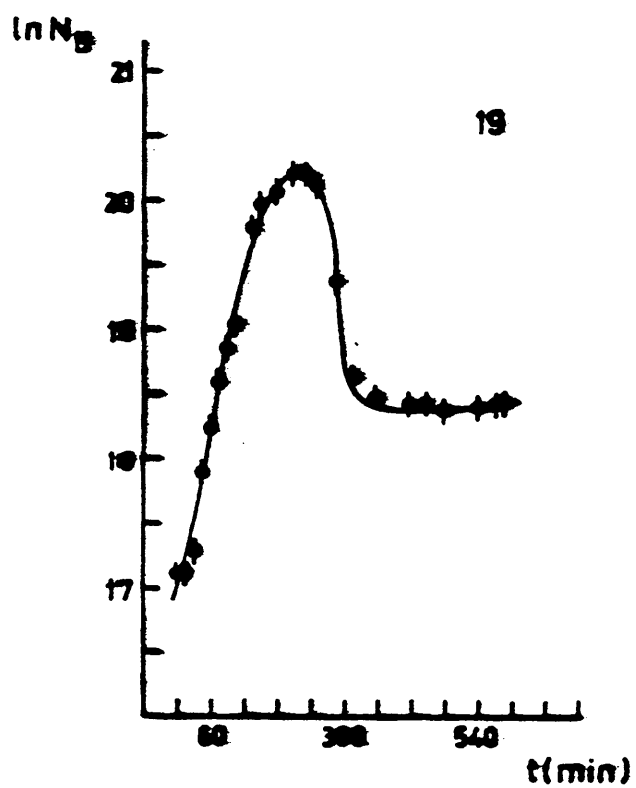
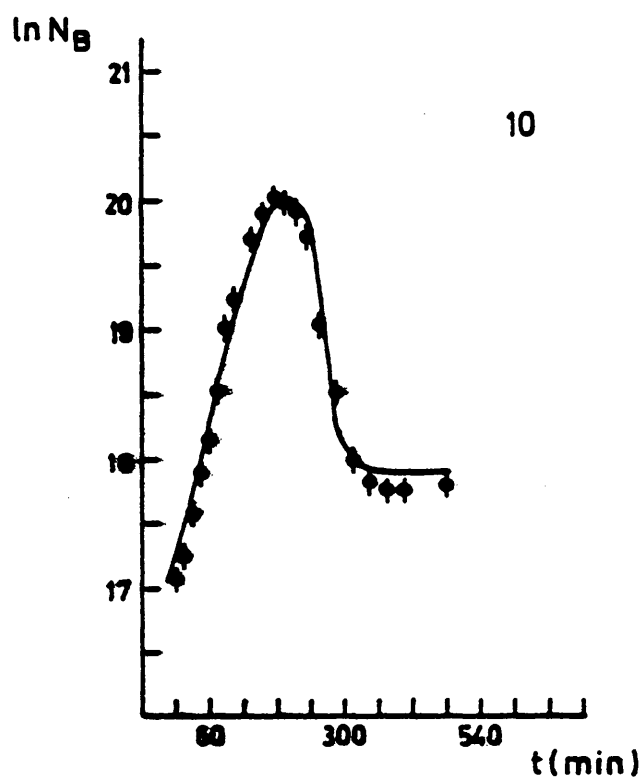
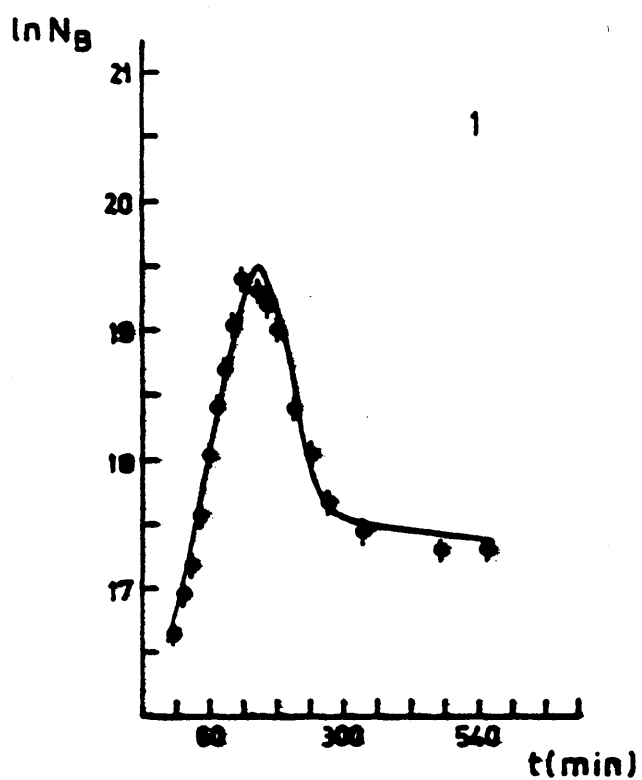


FIG V-42

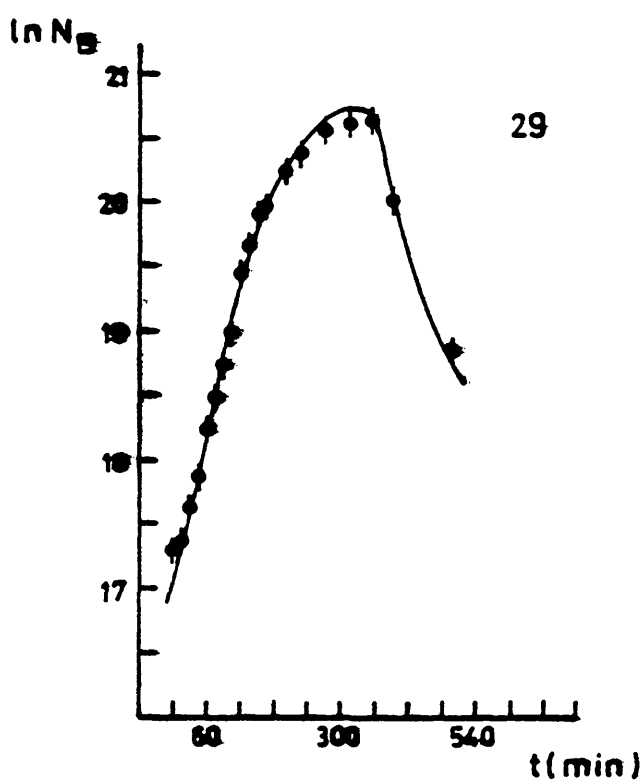
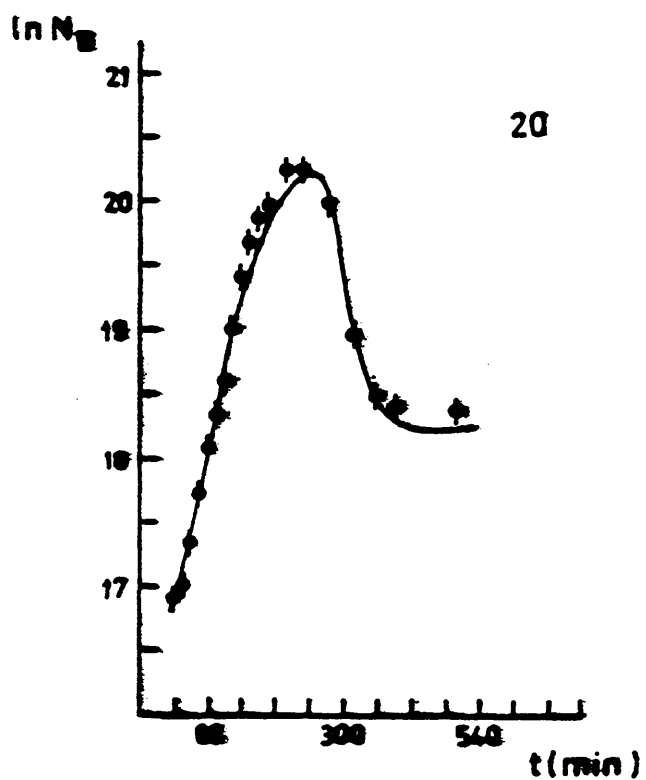
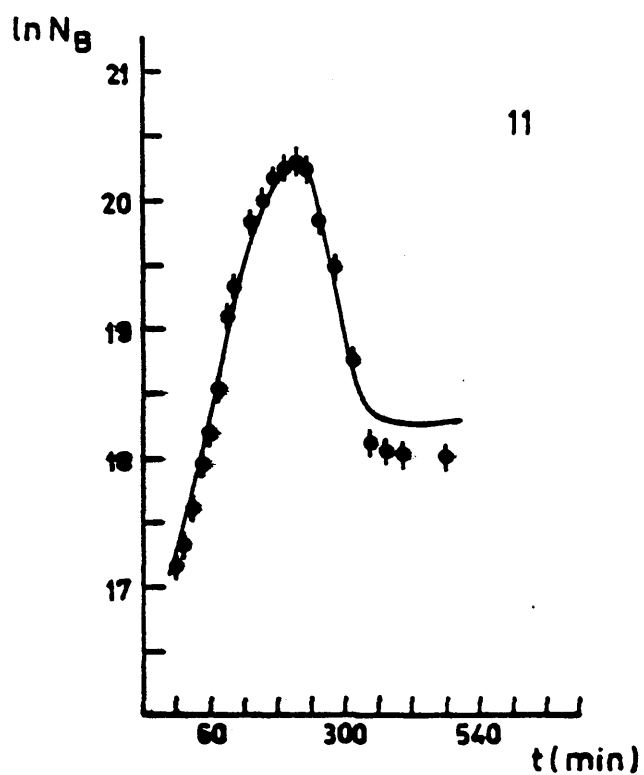
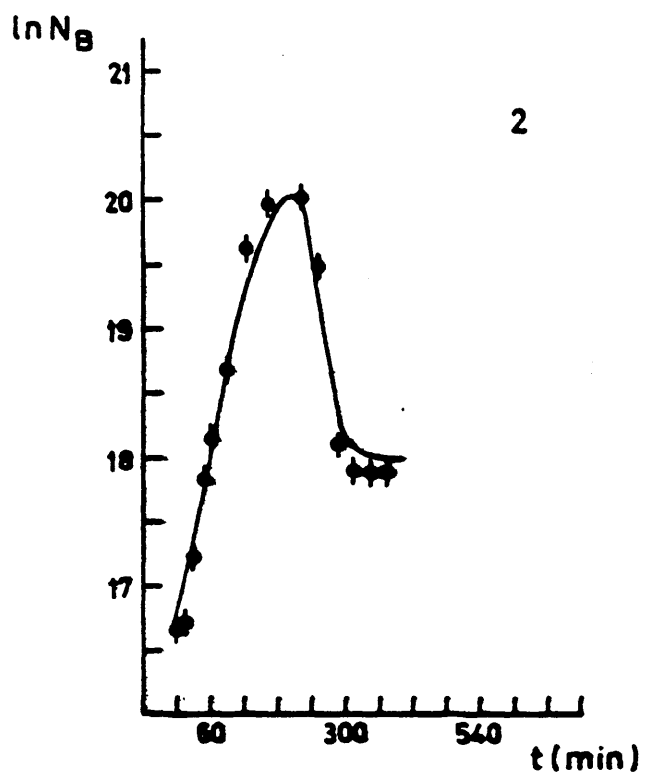


FIG. V-43

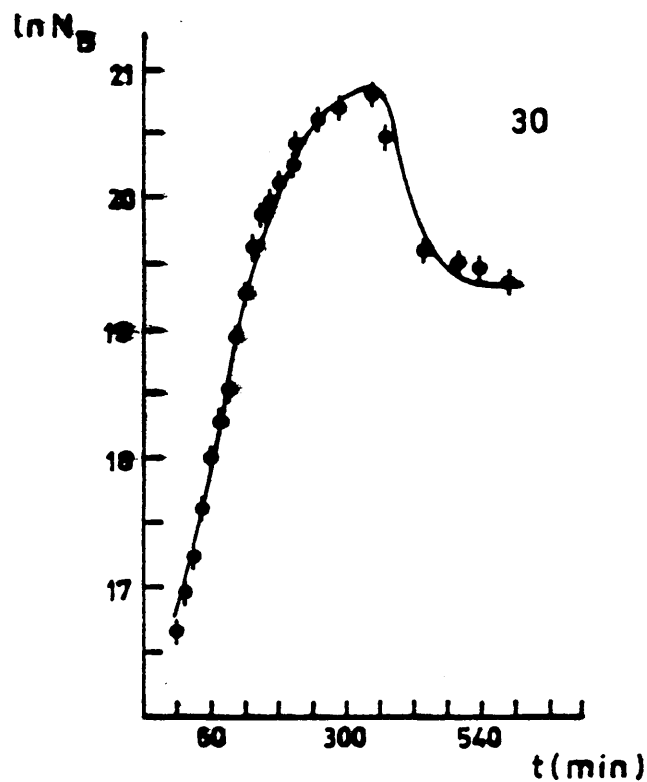
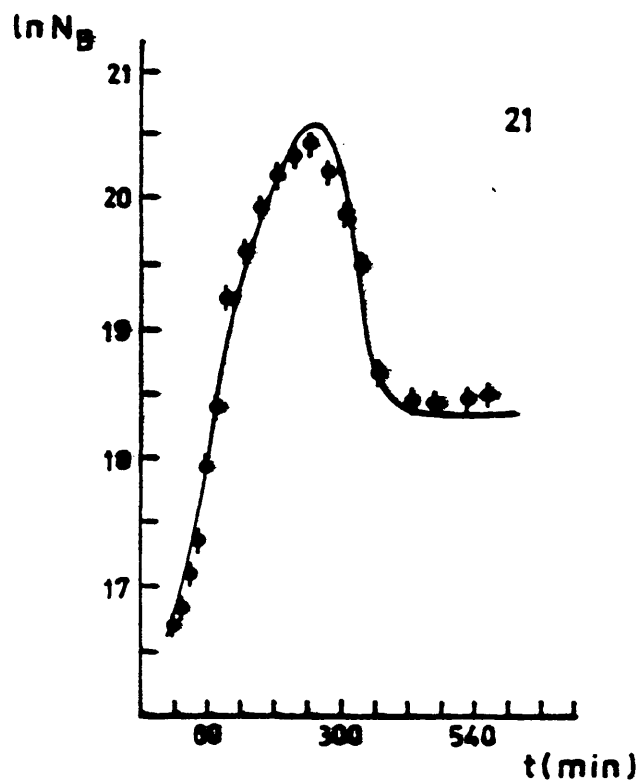
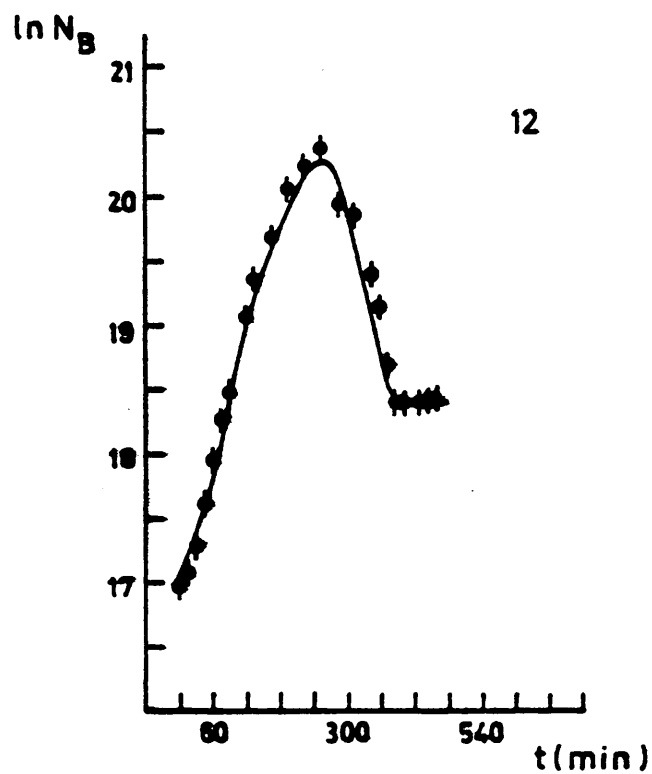
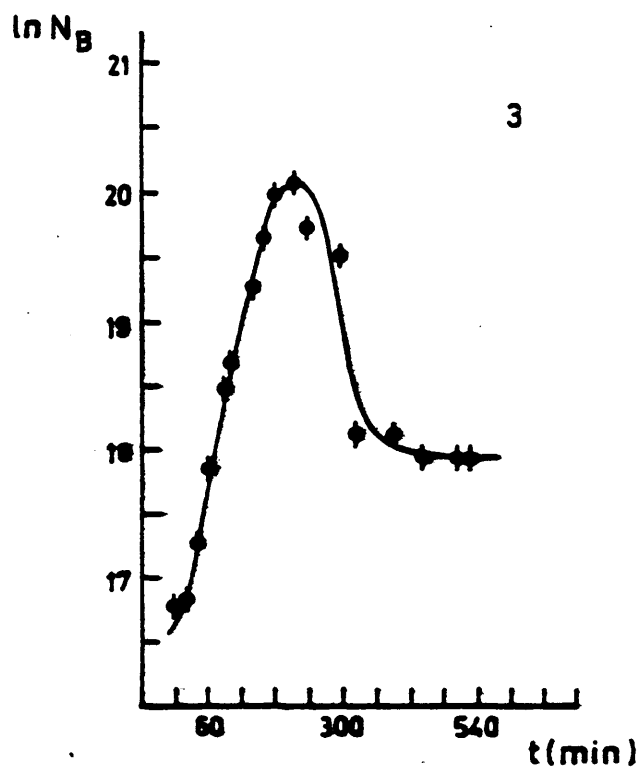


FIG. V-44

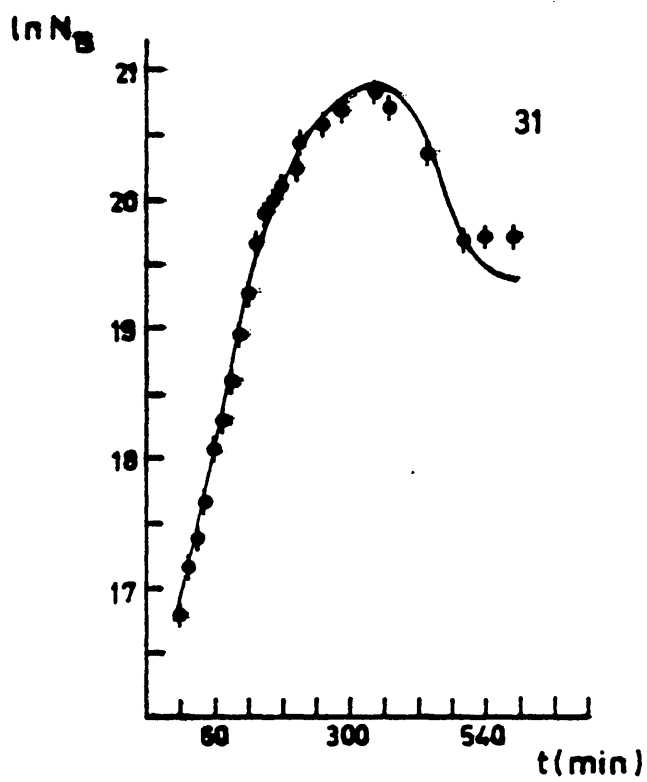
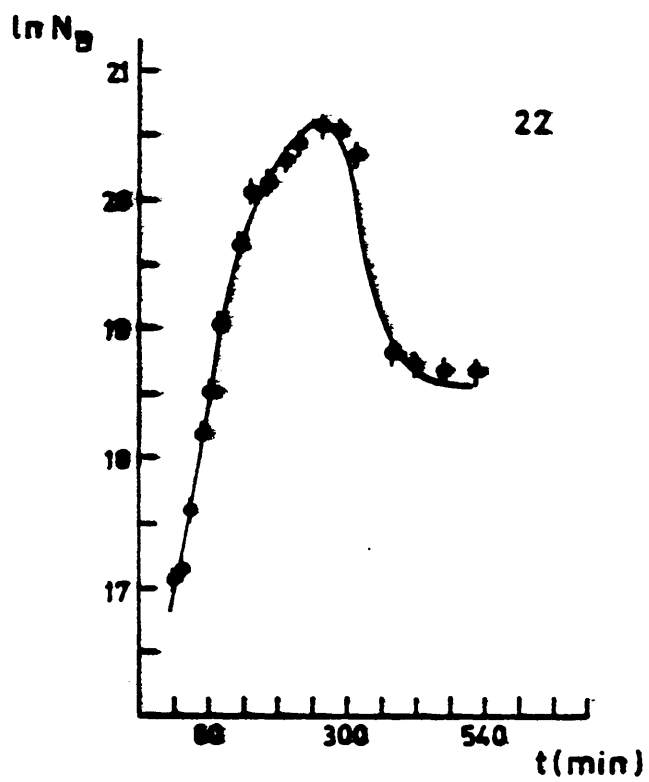
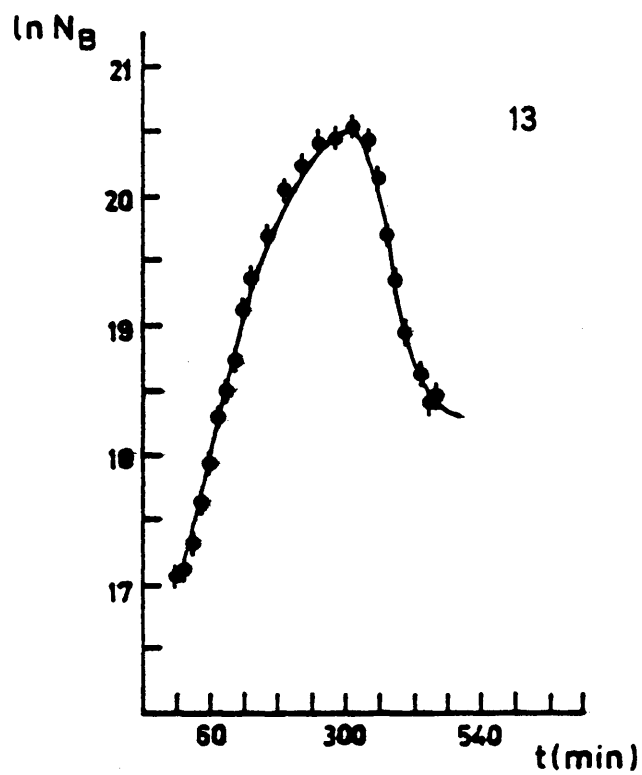
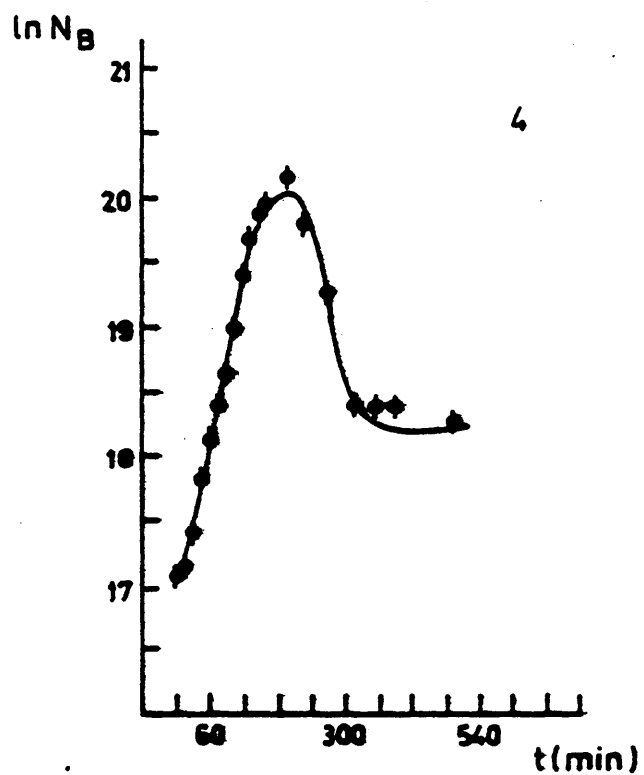


FIG. V-45

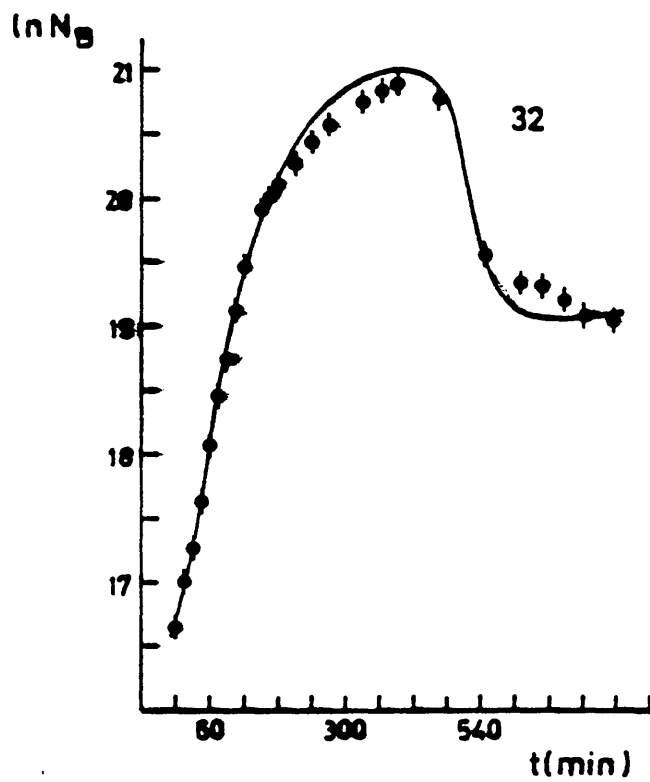
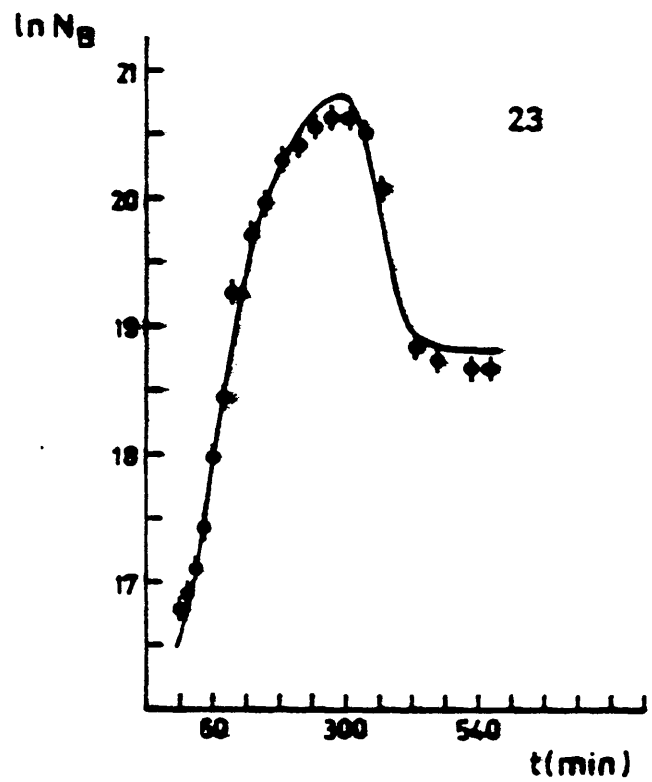
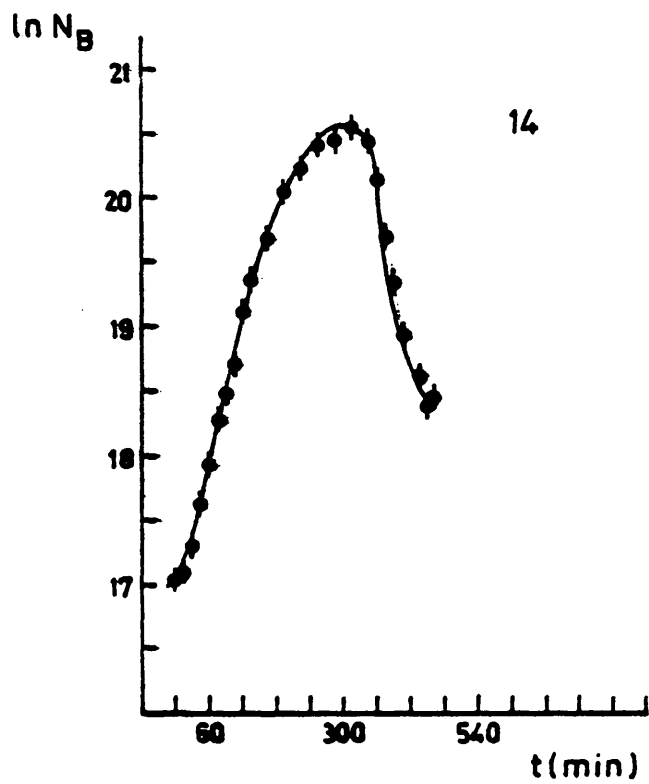
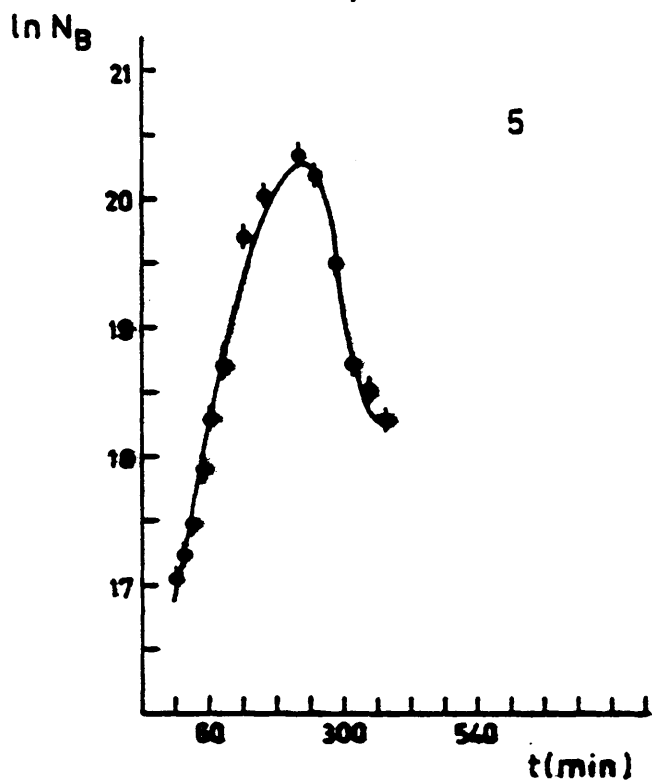


FIG. V-46

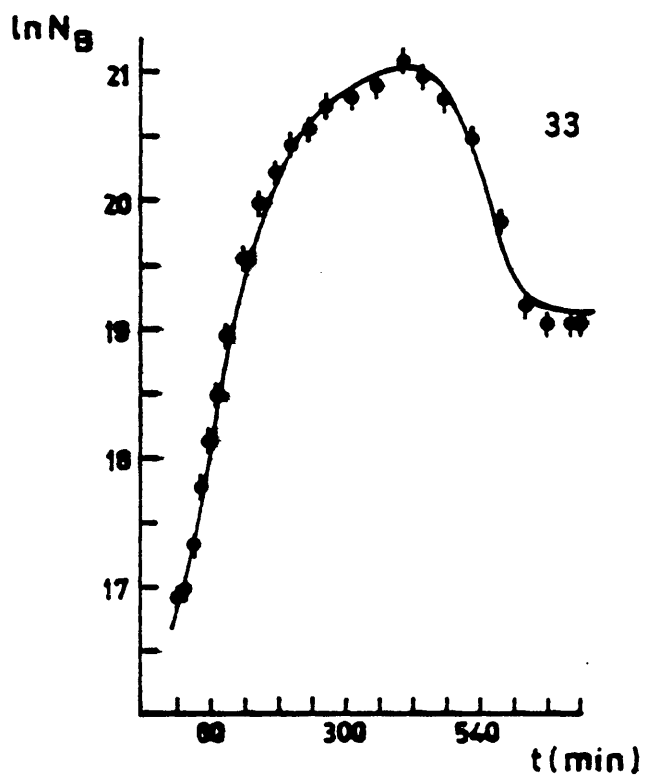
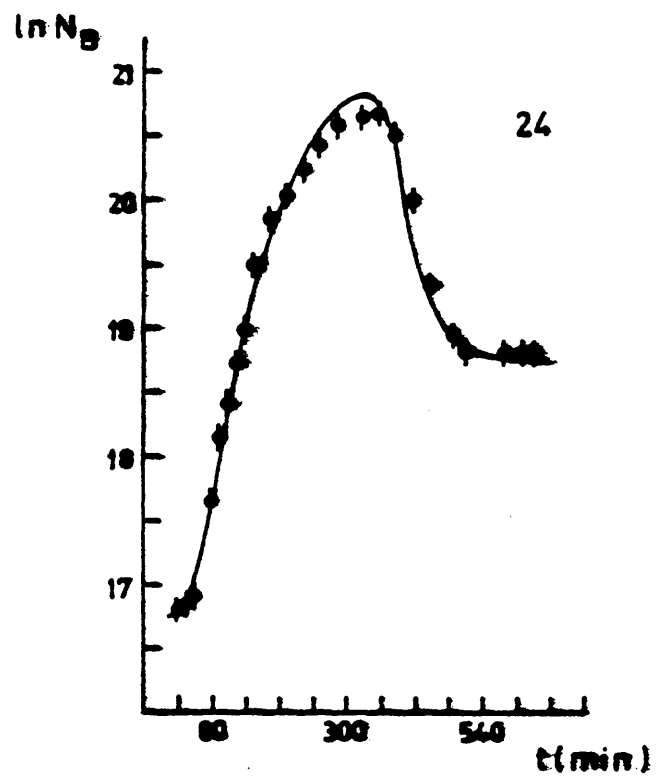
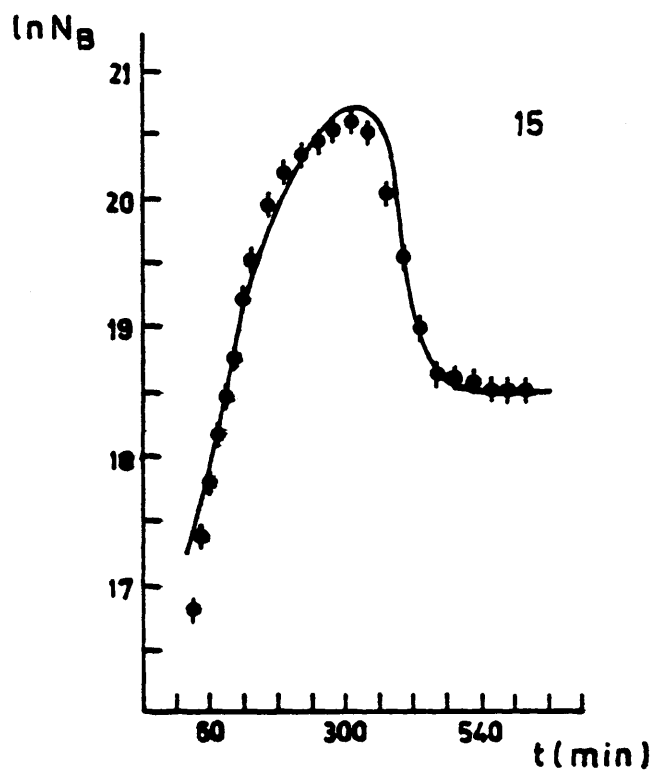
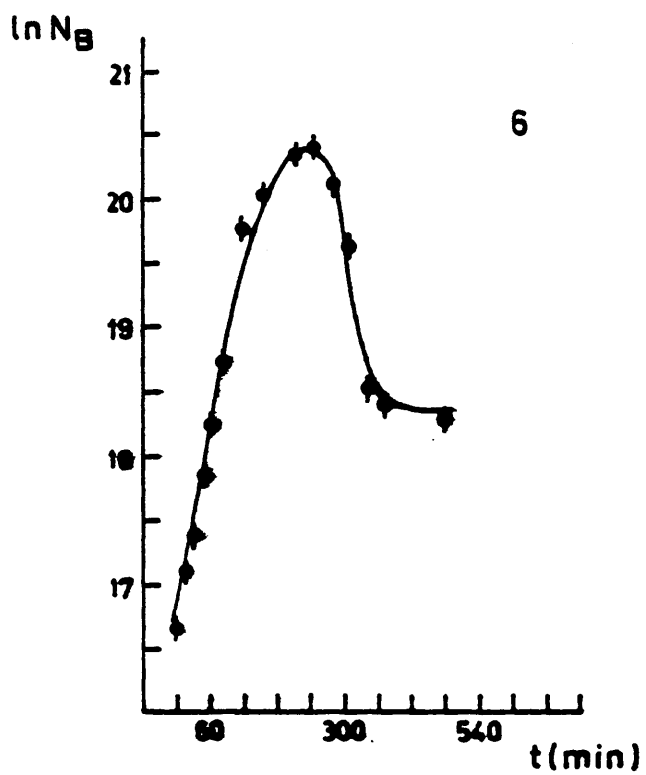


FIG. V-47

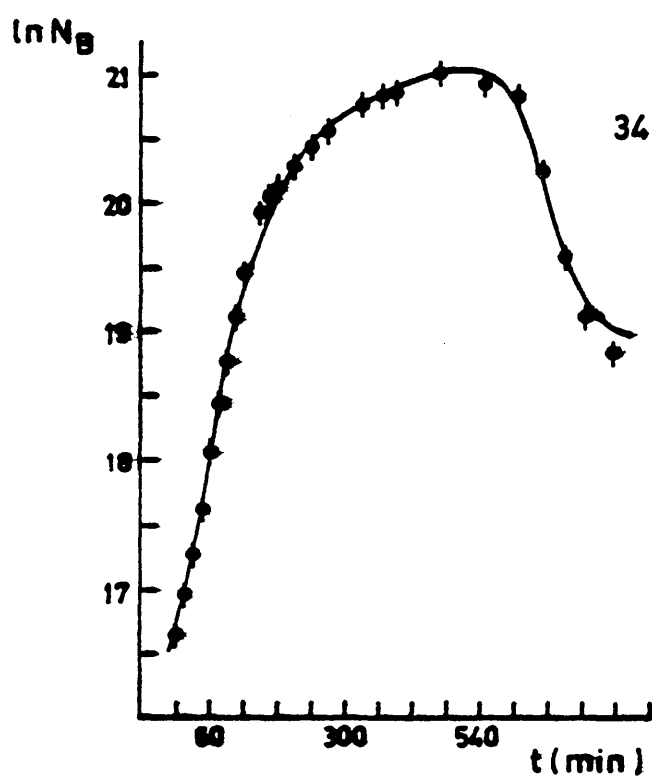
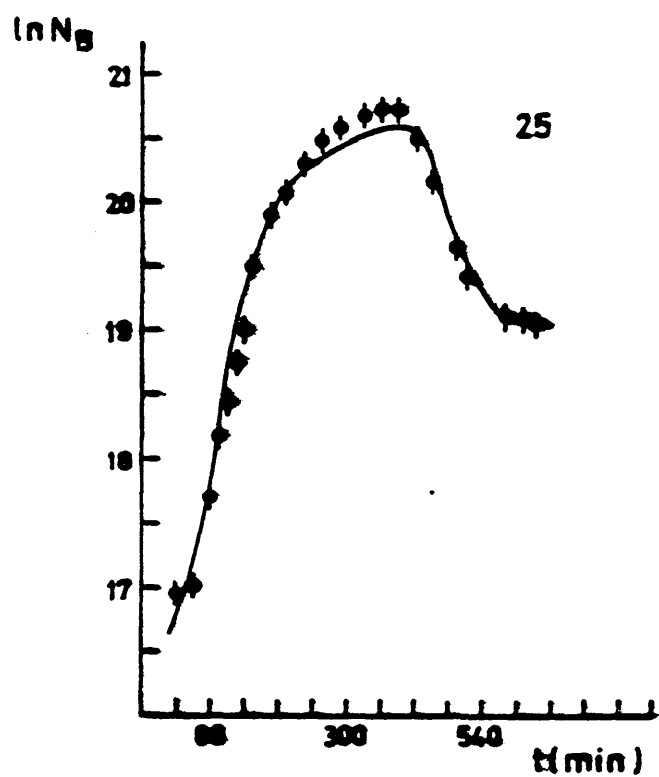
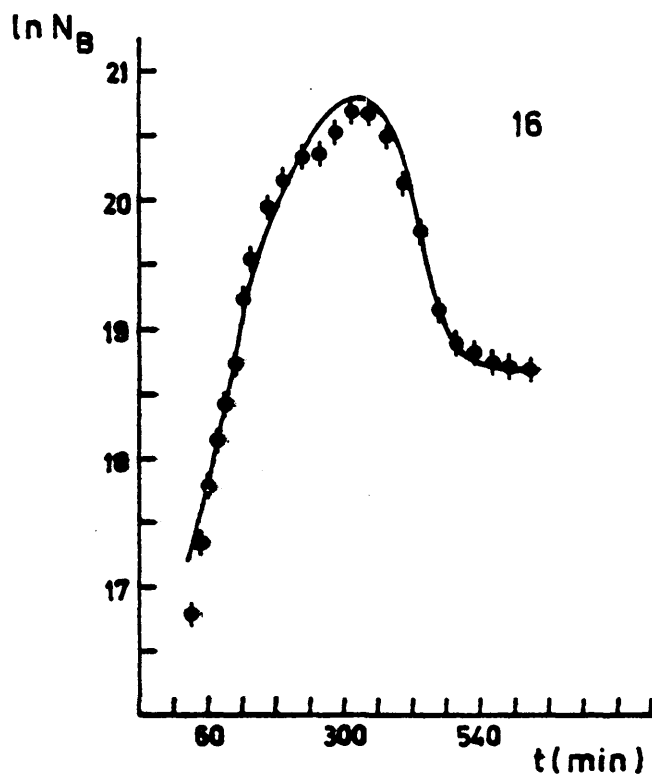
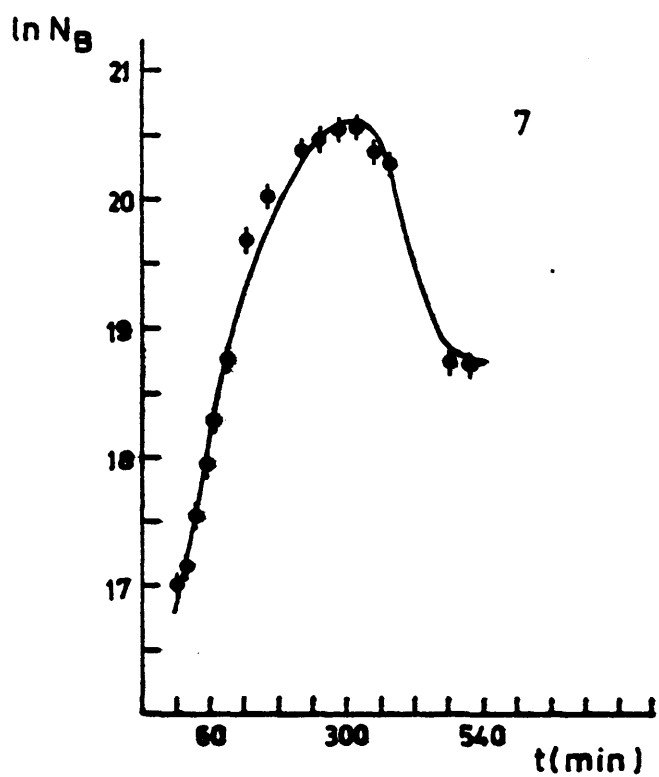


FIG. V-48



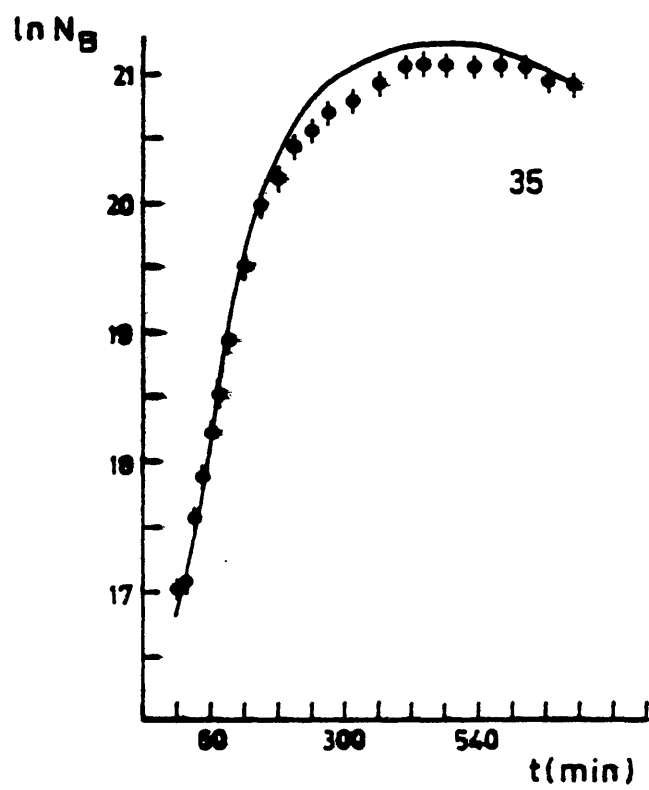
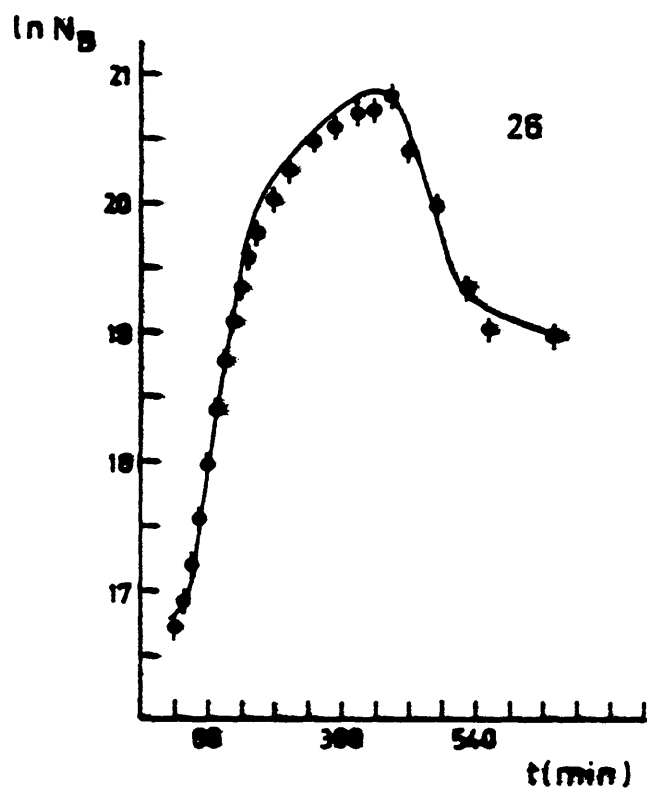
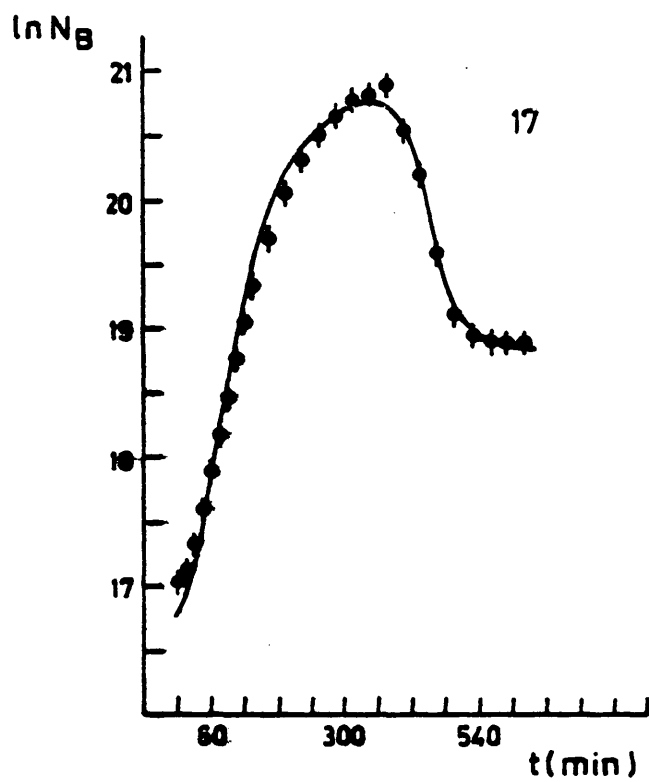
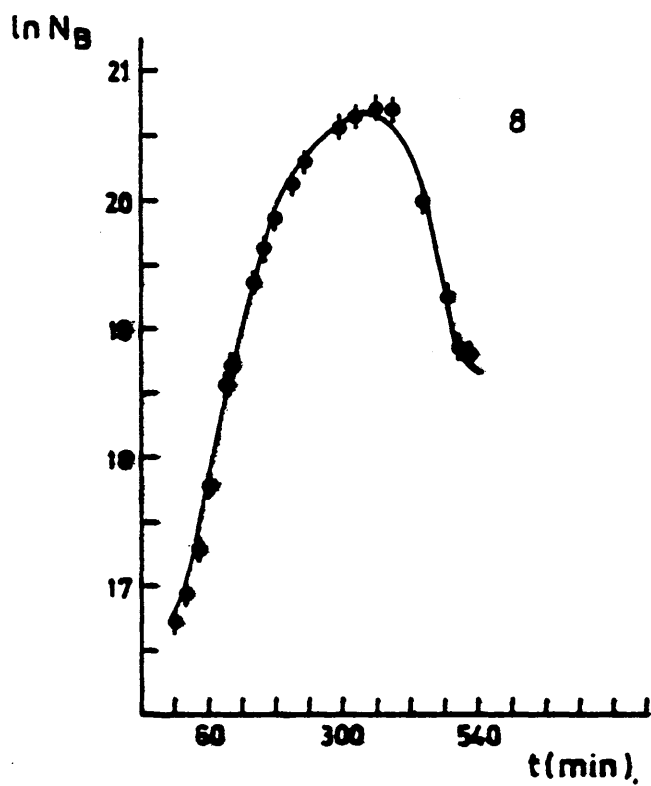


FIG. V-49

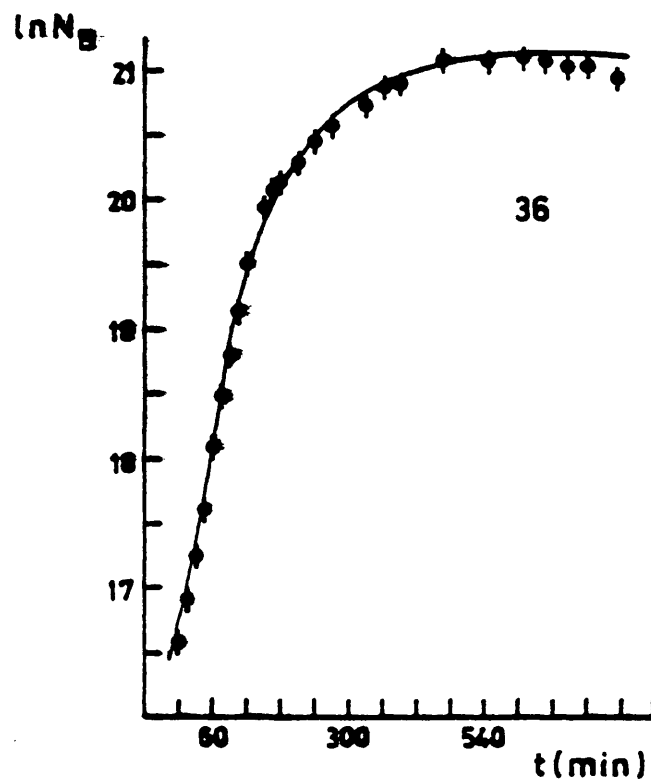
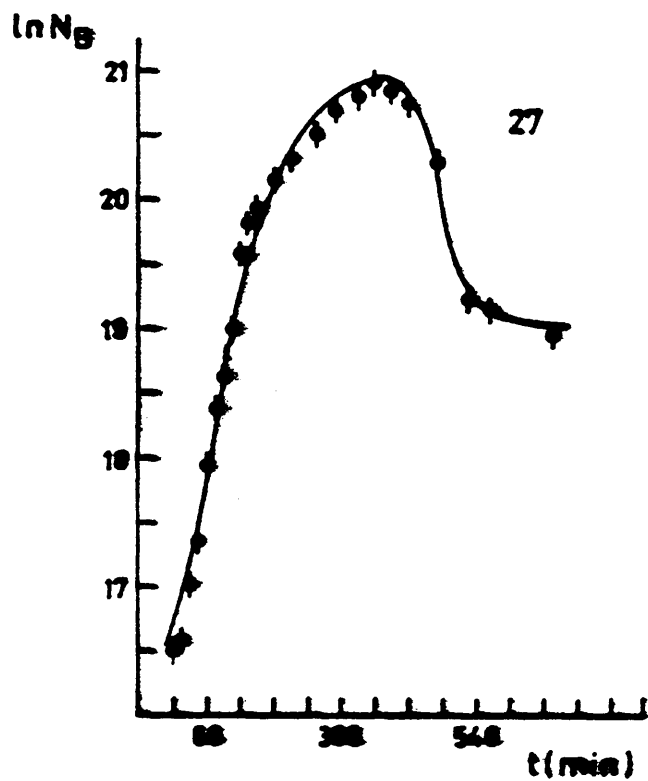
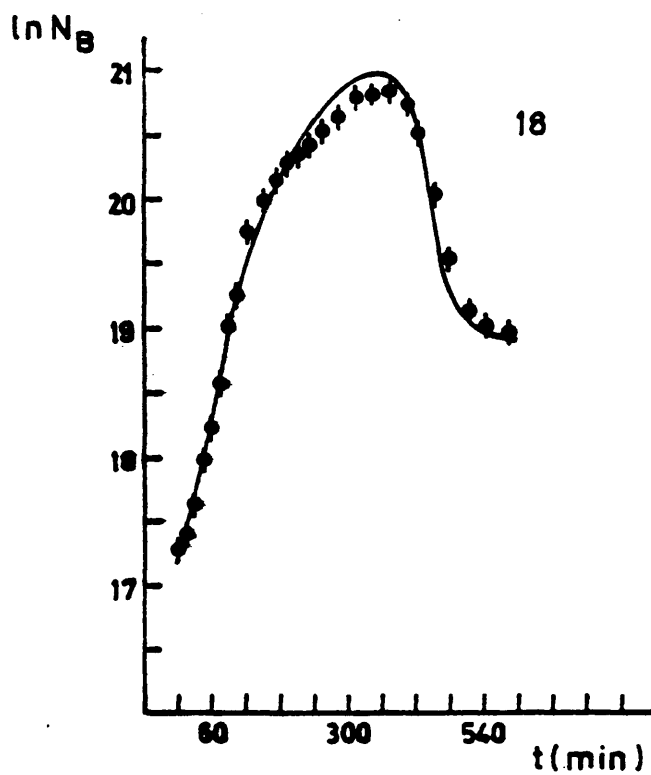
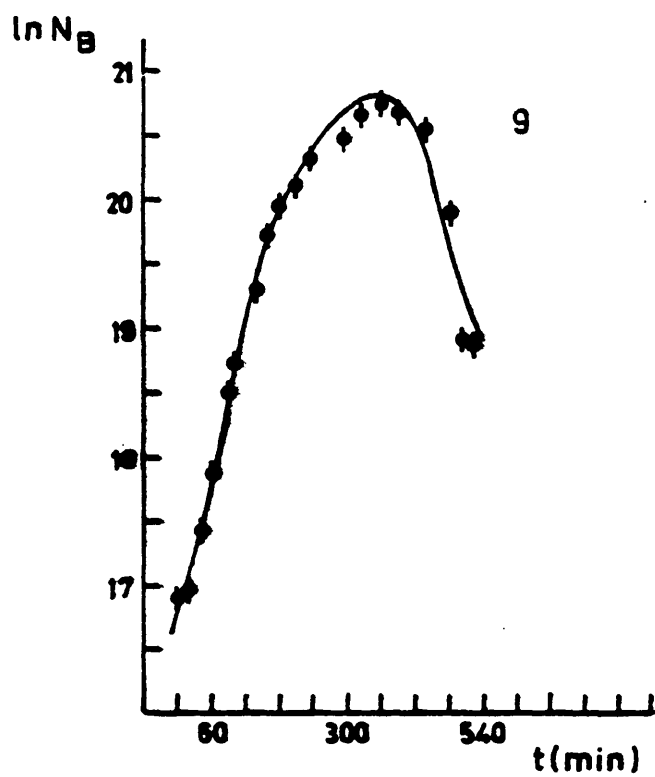


FIG. V-50

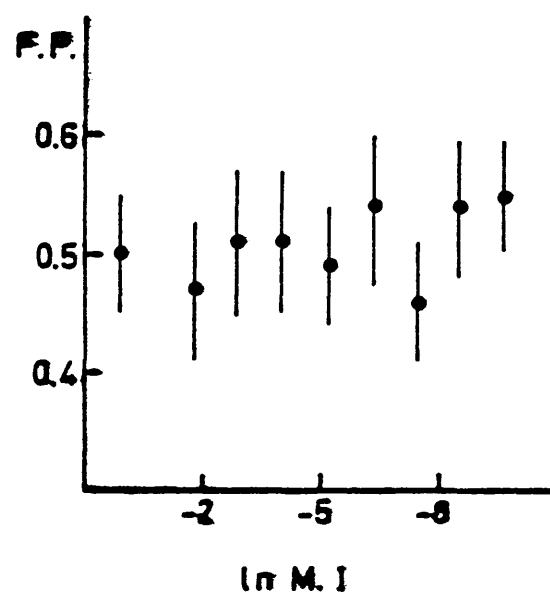
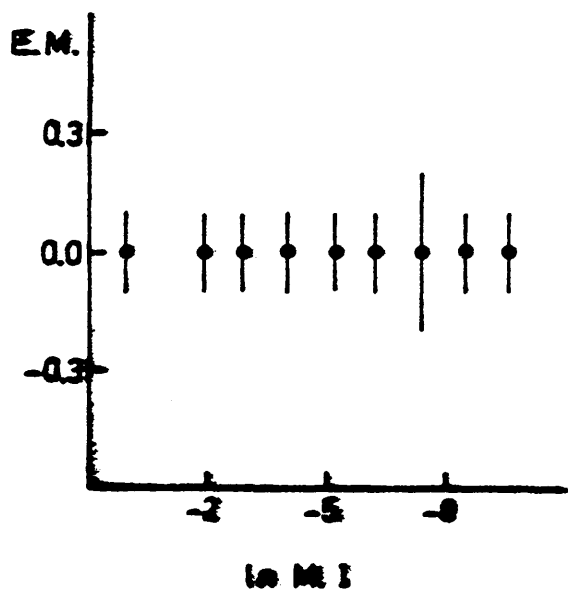
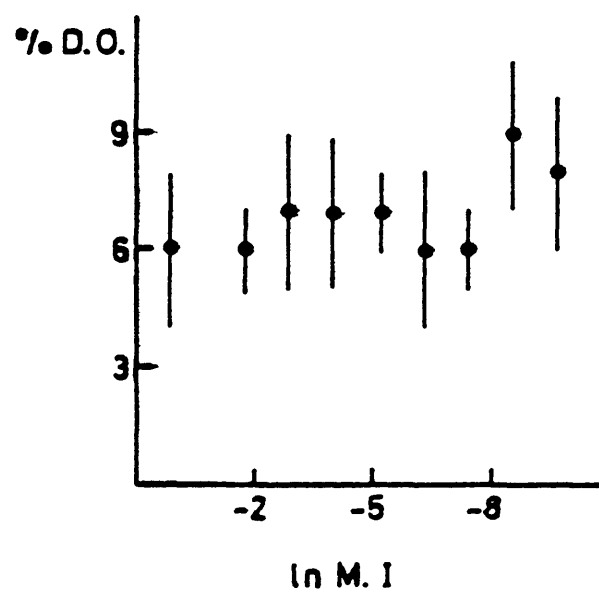
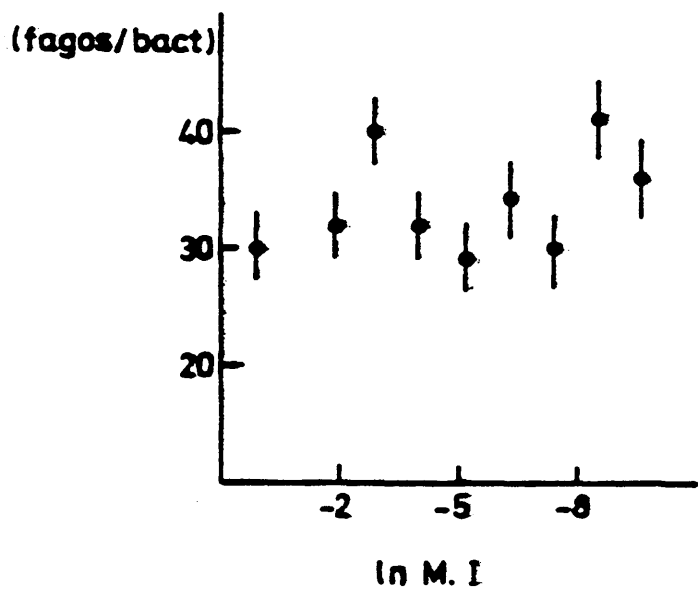
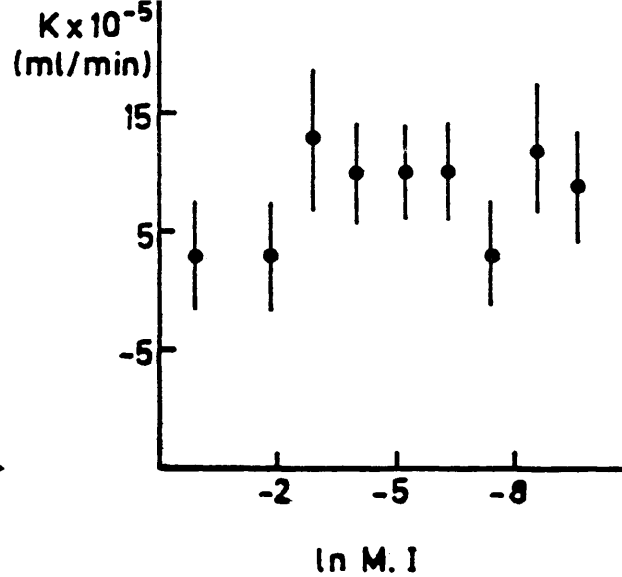
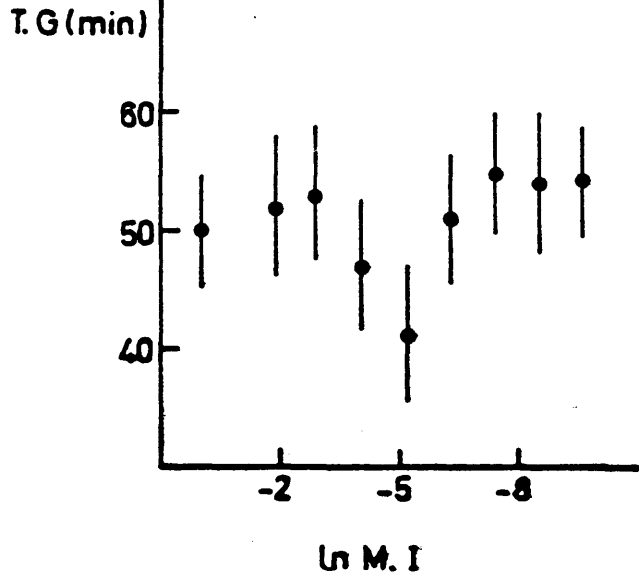
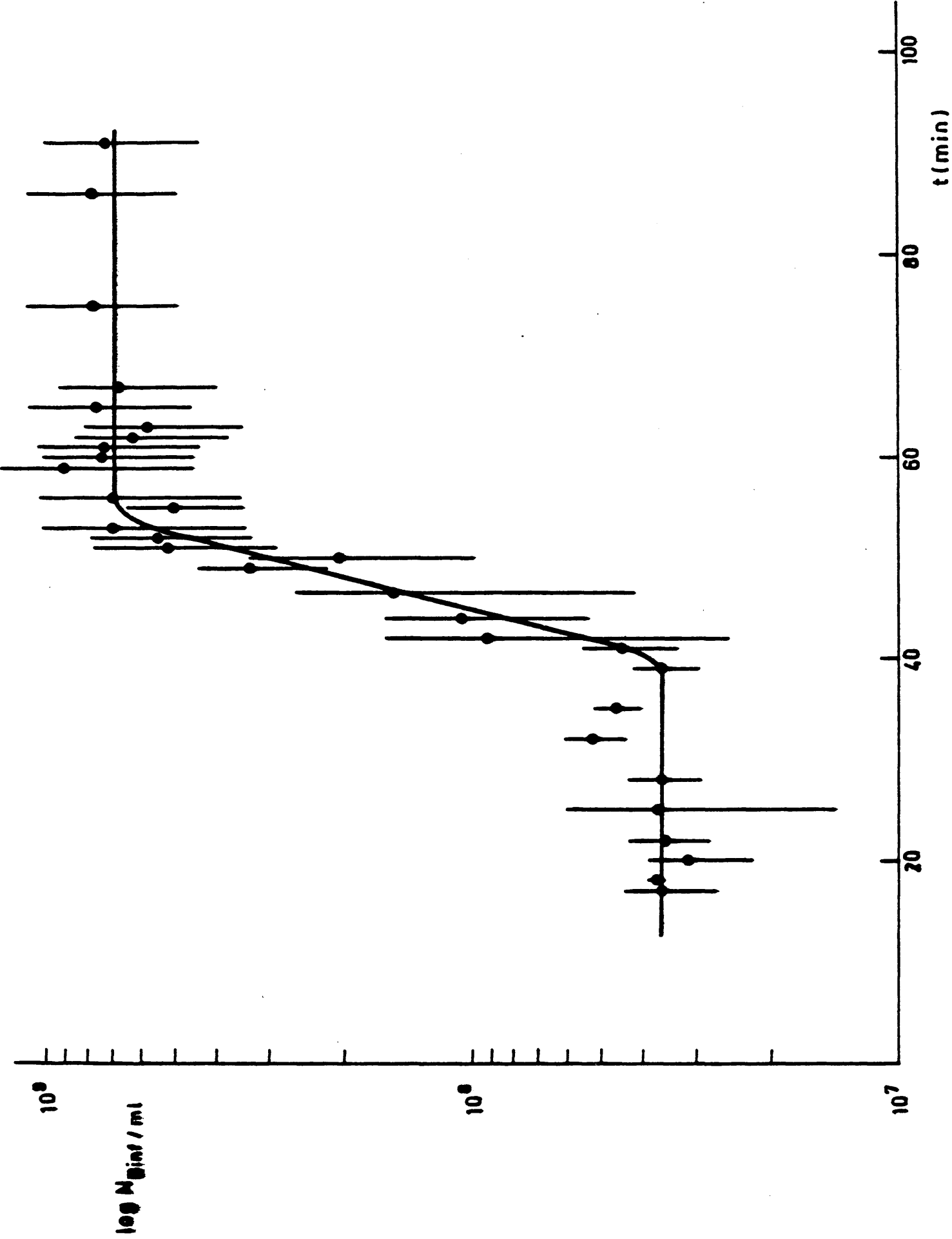


FIG. V-57



El presente trabajo ha tenido como objetivo una determinación precisa de la cinemática de la lisis de cultivos bacterianos por fagos y su interpretación numérica mediante la utilización de un modelo teórico expresamente desarrollado para ello.

El seguimiento de los procesos de lisis se ha llevado a cabo a través de la medida de densidades ópticas de los cultivos bacterianos en función del tiempo, desde la inoculación hasta la lisis completa del cultivo. La experimentación ha sido realizada infectando cultivos bacterianos de *E. coli* C<sub>600</sub> con el fago  $\lambda_{\text{clear I}}$ .

El modelo teórico interpretativo del proceso de lisis ha sido formulado de forma factorizada atendiendo a las tres fases esenciales de: Aproximación de fagos a bacterias, infección y generación de nuevos fagos y explosión bacteriana. Las expresiones que traducen el comportamiento de un cultivo bacteriano infectado han sido expuestas detalladamente en los capítulos que preceden y no se incluyen aquí. La formulación de estas expresiones ha requerido:

1.- La parametrización integrada de las distintas fases de la curva de crecimiento bacteriano y su correspondiente comprobación experimental. Las expresiones utilizadas III.2.1, III.2.2 y III.2.4 proporcionan los siguientes valores para los parámetros:

Pendiente de la zona de latencia (a) =  $0.00021 \pm 0.0004$

Pendiente de la zona de crecimiento exponencial ( $a_0$ ) =  $0.0196 \pm 0.0005$

Pendiente de la zona preestacionaria-estacionaria (c) =  $0.0098 \pm 0.0004$

Tiempo al que finaliza la zona de crecimiento exponencial =  $130 \pm$

24

2.- El desarrollo de una expresión para calcular el número de fagos - promedio adherido a bacterias y restos celulares en función del tiempo. La validez de la referida expresión ha sido comprobada experimentalmente. Concretamente la expresión básica desarrollada es la III.3.5.

de una expresión empírica válida para la descripción del proceso de aproximación fago-bacteria (en nuestras condiciones experimentales). La expresión propuesta es la III.3.3

De esta forma la interpretación global del modelo desarrollado depende exclusivamente de:

1.- Las dos variables que definen el proceso de lisis. Momento y multiplicidad de la infección.

2.- Seis parámetros a determinar, con los cultivos experimentalmente medidos, que interpretan los fenómenos biológicos siguientes:

- a) Tiempo de generación del fago
- b) Tamaño de la explosión bacteriana
- c) Parámetro que describe la aproximación de fagos a bacterias de acuerdo con la expresión considerada (III.4.6)
- d) Relación entre la absorción luminosa de los restos celulares - procedentes de las explosiones bacterianas y la de la propia - bacteria
- e) Fracción indicativa de la adherencia de los fagos a los restos celulares con relación a su capacidad de adherencia a las bacterias
- f) Potencialidad de los fagos resultantes de la explosión bacteriana indicativa de su capacidad de provocar la lisis posterior de otra bacteria.

Hemos seguido detalladamente los procesos de lisis correspondientes a 36 situaciones experimentales diferentes, cuatro momentos de infección por nueve multiplicidades distintas, y los datos experimentales - han sido utilizados para, aplicando el modelo, obtener los valores de - los parámetros de interés biológico, mediante un proceso de optimización numérica.

Los resultados obtenidos para los parámetros indicados han sido, en el caso de la bacteria y el fago referidos, los siguientes:

- c - Velocidad de aproximación fago-bacteria =  $(5.5 \pm 1.7) \times 10^{-5}$  ml/min
- d - Relación entre la absorción de luz de los restos celulares y las bacterias =  $0.065 \pm 0.005$
- e - Fracción de fagos adheridos a restos celulares respecto a bacterias =  $0.07 \pm 0.04$
- f - Factor de "potencialidad de fagos" =  $0.47 \pm 0.02$   
 Tamaño de la explosión bacteriana (viables) =  $(31 \pm 1) \times (0.47 \pm 0.02)$   
 =  $15 \pm 1$  fagos/bacteria.

Dichos resultados han sido parcialmente comprobados, mediante experimentaciones adecuadas, con objeto de evaluar la validez de nuestro modelo. Los resultados obtenidos, al menos en lo que concierne al tiempo de generación del fago, el tamaño de la explosión bacteriana y el parámetro representativo de la aproximación de fagos a bacterias han estado de acuerdo con las predicciones deducidas del modelo. Los valores obtenidos han sido los siguientes:

- Tiempo de generación del fago =  $47 \pm 4$  minutos
- Tamaño de la explosión bacteriana =  $19 \pm 4$  fagos/bacteria
- Velocidad de aproximación fago-bacteria =  $6.3 \pm 0.4 \times 10^{-5}$  ml/min

Consideramos por lo tanto que el modelo predice fielmente las características de los procesos de lisis, en base a los datos obtenidos mediante la evolución de la densidad óptica del cultivo bacteriano, y que sus predicciones son útiles para caracterizar dichos procesos de lisis. Además se obtienen como resultados complementarios la evolución del número de fagos y restos celulares en el medio con el tiempo, durante todo el proceso de la lisis.

en forma numerica, es decir, como un programa de ordenador, escrito en un lenguaje de alto nivel como FORTRAN V. Es por lo tanto traspasable a cualquier usuario que lo necesite.



A continuación se presenta un listado de cada una de las subrutinas - que ha sido necesario desarrollar para realizar el trabajo objeto de esta memoria. En esencia la subrutina fundamental que controla todo el proceso de minimización numérica es la subrutina FCN, que calcula el valor de la - función a minimizar (F), dados los valores de unos determinados parámetros almacenados en el vector X. Ambos figuran como argumentos de la subrutina que es llamada cada vez que MINUIT, mediante el método iterativo de optimi- zación, necesita conocer el valor de la función F que corresponde a unos - determinados valores paramétricos X. El resto de las subrutinas son llama- das desde FCN y contienen los distintos algoritmos de cálculo. Las cartas de datos del programa son muy sencillas y la descripción de sus funciones puede encontrarse en F. James (1976) o deducirse de las sentencias de lec- tura incluidas en la subrutina FCN.

```

SUBROUTINE FCN (NPAR,G,F,XPP,IFLAG)
COMMON/EVOL/TEM(2000),BACT(2000),FAGO(2000),EFIS(2000),IDAT,
1VFAG(2000),VMEM(2000),AUX,PDBAC(2000),PP1,PP2,BACS(2000),PP3
COMMON/JUAN/ANFT
DIMENSION X(10),BN(50,20),EBN(50,20), T(50,20),XCB(7,20),XCBP(7)
1,C(20),YCB(7,20)
DIMENSION TEOH(50,20),N(20),TN(50,20),VE(50),EVE(50),VT(50),VX(50)
DIMENSION DO(50,20),FDIL(50,20),DELD0(50,20),EFDIL(50,20)
DIMENSION XPP(10)
DIMENSION PFT(100),PET(100),PMT(100),PBT(100),TTT(100),EPFE(100),
1EPEE(100),EPME(100),EPBE(100)
DIMENSION PF(100,20),PE(100,20),PM(100,20),PB(100,20),PT(100,20),
1NUP(20)
DIMENSION ANFAG(20),ENFAG(20),ATFAG(20),TEOF(20)
COMMON/LARA/ITTT(50)
COMMON/TEMP/TT(5)

```

-----CORRECCION PARA AJUSTES ADICIONALES-----

```

DATA X/55.400,.0000414,40.973,.00003230,.63059,.44257
1,8.1570,28.991,31.240,19.020/
DATA =AEL/0./

```

-----FINAL CORRECCION-----

```

DATA NMINI/0/
DATA VENTR/0/
NENTR=NENTR+1

```

```

*****
EL CAMON EVOL CONTIENE TIEMPOS ,BACTERIAS,FAGOS,EFICACIAS,..ETC.
PARA CADA INTERVALO DE LA SERIE QUE SE CALCULA EN MAESTR PARA
CADA CURVA DE LISIS.
EL CAMON TEMP TIENE LOS TIEMPOS QUE DEFINEN LA CURVA DE
CRECIMIENTO BACTERIAL
EL CAMON JUAN GUARDA ...ANFT(NUMERO TOTAL DE FAGOS LIBRES ...)
*****

```

-----CORRECCION PARA AJUSTES ADICIONALES -----

```

DO 65 I=1,10
65 X(I)=XPP(I)
X(2)=XPP(2)/10.**5

```

-----FINAL CORRECCION-----

```

.....CORRECCION PARA CONSIDERAR LAS.....
.....MEMBRANAS EN LA DENSIDAD OPTICA.....
PD0M=X(4)

```

.....FINAL CORRECCION MEMBRANAS.....

```

GO TO (1,2,2,2),IFLAG
*****

```

```

1 CONTINUE
AUX=ALOG(3.001)
CALL JZERO(TEOH,1,1000)
NMINI=NMINI+1
IF (NMINI.GT.10) GO TO 13
CALL JZERO(N,1,20)

```

```

*****
LECTURA DE DATOS
NEXP=NUMERO DE CURVAS DE LISIS
N(I)=NUMERO DE PUNTOS POR CURVA DE LISIS
DO,T,FDIL,EFDIL SON DENSIDAD OPTICA,TIEMPO,DILUCION,ERROR EN LA
DILUCION PARA CADA PUNTO DE LA CURVA DE LISIS

```

INTRODUCCION Y CONCENTRACION DE FAGOS,  
BN Y EBN NUMERO DE BACTERIAS Y SU ERROR

\*\*\*\*\*

READ (5,100) NEXP

READ (5,99) (N(I),I=1,NEXP)

READ (5,4721) ((ANFAG(I),ENFAG(I)), I=1,NEXP)

WRITE (6,4721) ((ANFAG(I),ENFAG(I)), I=1,NEXP)

21 FORMAT (8F10.2)

\*\*\*\*\*

ANFAG(I) Y ENFAG(I) CONTIENEN LOS LOG. DEL  
NUMERO DE FAGOS Y SU ERROR PARA EL EXP. I  
ATFAG ES EL LOG. DEL NUMERO DE FAGOS TEORICO

\*\*\*\*\*

99 FORMAT (20I4)

100 FORMAT (I20)

DO 12 L=1,NEXP

READ (5,101) (YCB(I,L),I=1,7)

WRITE (6,101) (YCB(I,L),I=1,7)

K=N(L)

READ (5,103) (DO(J,L),T(J,L),FDIL(J,L),EFDIL(J,L),J=1,K)

WRITE (6,103) (DO(J,L),T(J,L),FDIL(J,L),EFDIL(J,L),J=1,K)

ANFAG(L)=EXP(ANFAG(L))

ENFAG(L)=ENFAG(L)\*ANFAG(L)

DO 11 I=1,K

DELD0(I,L)=0.037\*DO(I,L)

BN(I,L)=244000000.\*DO(I,L)

EBN(I,L)=SQRT((17100000.\*DO(I,L))\*\*2+(244000000.\*DELD0(I,L))\*\*2)

EBN(I,L)=SQRT((EBN(I,L)\*FDIL(I,L))\*\*2+(BN(I,L)\*EFDIL(I,L))\*\*2)

BN(I,L)=BN(I,L)\*FDIL(I,L)

EBN(I,L)=EBN(I,L)/BN(I,L)

BN(I,L)=ALOG(BN(I,L))

11 CONTINUE

DO 15 I=1,K

K1=K+2-I

K2=K1-1

BN(K1,L)=BN(K2,L)

EBN(K1,L)=EBN(K2,L)

15 T(K1,L)=T(K2,L)

T(1,L)=T(K+1,L)+2.

\*\*\*\*\*

SE DEFINE PARA CADA CURVA DE LISIS UN PRIMER PUNTO T(1,L) MAS  
ADELANTE QUE TODOS LOS EXPERIMENTALES. SE UTILIZA PARA INTERPOLAR  
LOS VALORES TEORICOS EN CADA PUNTO DE LA LISIS

\*\*\*\*\*

BN(1,L)=BN(K+1,L)

EBN(1,L)=EBN(K+1,L)

12 CONTINUE

DO 16 L=1,100

EPFE(L)=0.01

EPEE(L)=0.0001

EPME(L)=0.01

16 EPBE(L)=0.01

101 FORMAT (4F10.5,F10.8,2F10.5)

103 FORMAT (4(10X,F10.5))

XCB(1) PENDIENTE DE PRIMERA PARTE EXPONENCIAL

XCB(2) PENDIENTE DE SEGUNDA PARTE EXPONENCIAL

XCB(3) TIEMPO FINAL DE LA ZONA EXPONENCIAL

XCB(4) PENDIENTE DE LA TERCERA PARTE DEL CRECIMIENTO

XCB(5) ES LA CONCENTRACION INICIAL DE FAGOS

XCB(6) ES EL TIEMPO DE INTRODUCCION DE FAGOS

```

X(3) ES EL TAMANO DE LA EXPLOSION
X(4) ES EL PARAMETRO D.O. MEMBRANAS
X(5) ES EL PARAM. APROX. FAGOS A MEMBRANAS
X(6) ES EL FACTOR DE POTENCIALIDAD DE FAGOS
X(6+1) SON LOS TIEMPOS DE DECALAJE
13 CONTINUE
NEXP=NEXP-1
RETURN
2 CONTINUE
CALL JCOPY(YCB,XCB,143)
DO 17 L=1,NEXP
K=N(L)
*****
SE REDEFINE LA POSICION DEL PRIMER PUNTO DEPENDIENDO DE SI
ESTAMOS EN EL AJUSTE O SI HEMOS TERMINADO CON EL (IFLAG=3)
*****
IF (IFLAG.EQ.3) T(1,L)=T(K+1,L)*1.5
IF (IFLAG.NE.3) T(1,L)=T(K+1,L)+4.0
17 CONTINUE

PASO AL AJUSTE

F=0.
NT=3
DO 20 I=1,NEXP
J=I+6
C(I)=X(J)
20 NT=NT+N(I)+1
NTE=N(I)+1
K=1
IRES=J
NFLAG=0
*****
C(I) SON LOS DECALAJES
K INDICA LA CURVA DE LISIS EN QUE NOS ENCONTRAMOS
IRES ES UN FLAG QUE SE UTILIZA PARA PODER SABER EL PUNTO EN QUE
NOS ENCONTRAMOS DENTRO DE CADA CURVA DE LISIS (J)
I ES EL NUMERO DE PUNTO TOTAL EN QUE NOS ENCONTRAMOS
TF ES EL TIEMPO DE INFECCION
TE Y TEP SON LOS TIEMPOS DE LAS DETERMINACIONES EXPERIMENTALES
*****
DO 21 I=1,NT
IF (N(K).EQ.0) GO TO 21
*****CORRECCION AJUSTE PENDIENTES*****
KLL=K+6
XCB(2,K)=YCB(2,K)*(1.+0.25*XPP(KLL))
*****FINAL CORRECCION AJUSTE PENDIENTES*****
BINIKI=XCB(7,K)
BIN=EXP(BINIKI)
J=I-IRES
TT(1)=0.
TT(2)=XCB(2,K)/(XCB(1,K)*2.0)
TT(3)=(XCB(4,K)-XCB(2,K))/(2.0*XCB(3,K))
TT(4)=XCB(4,K)
TT(5)=300000.
TT(3)=XCB(3,K)
TT(4)=300000.
EX=BN(J,K)
EEXP=BN(J,K)*1.8
*****CORRECCION -AJUSTE TIEMPOS DE INFECCION*****

```

```

TF=XC3(5,K)+C(K)+10.*XFP(KPP)
*****.FINAL CORRECCION.*****
TE=T(J,K)+C(K)
TN(J,K)=TE
LL=K
TEP=TE
IF (TE.GT.TF) TE=TF
IF (TEP.GT.TF) NFLAG=NFLAG+1
IF (NFLAG.GT.1.AND.J.LT.NTE) GO TO 87
IF (J.LT.NTE) GO TO 22
*****
EN ESTA ZONA SOLO SE ENTRA CUANDO PASAMOS DE UNA A OTRA
CURVA DE LISIS
*****
NFLAG=C
K=K+1
NTE=N(K)+1
IRES=I
IF (NFLAG.GT.1) GO TO 87
*****
LO SIGUIENTE SIRVE PARA CALCULAR LAS BACTERIAS EN LAS ZONAS
ANTERIORES A LA INFECCION Y PARA EL PRIMER PUNTO DE CAUSA LISIS
DE FORMA QUE SE ITERE DESPUES A PARTIR DEL NUMERO DE BACTERIAS
CALCULADO PARA EL TIEMPO DE INFECCION
*****
22 JJ=IURSA(TE,TT,4)
IF (JJ.LT.1.OR.JJ.GT.3) GO TO 24
GO TO (25,26,27),JJ

AJUSTE DIFERENTES PARTES DE LA CURVA

25 CONTINUE
ARG=XC3(1,LL)*TE**2
TE0=BINIKI+ARG
GO TO 29
26 CONTINUE
ARG1=XC3(1,LL)*TT(2)**2
ARG2=XC3(2,LL)*(TE-TT(2))
TE0=BINIKI+ARG1+ARG2
GO TO 29
27 CONTINUE
ARG1=XC3(1,LL)*TT(2)**2
ARG2=XC3(2,LL)*(TT(3)-TT(2))
TE023=BINIKI+ARG1+ARG2
ARG3=XC3(3,LL)*(TT(4)-TT(3))**2
TE0C=TE023+ARG3
IF (JJ.EQ.4) GO TO 28
ARG4=-XC3(3,LL)*(TE-TT(4))**2
TE0=TE0C+ARG4
GO TO 29
28 CONTINUE
TE0=TE0C
BB=XC3(2,LL)/XC3(4,LL)
ARG3=-XC3(4,LL)*(TE-TT(3))
ARG3=EXP(ARG3)
ARG3=3B*(1.-ARG3)
IF (ARG3.LT.0.) GO TO 24
TE0=ARG3+TE023
GO TO 29
29 IF (TEP.LT.TF) GO TO 30
*****

```

```

ANT=EXP(TEO)
DO 243 M=1,7
XCBP(M)=XCB(M,LL)
43 CONTINUE
-----CORRECCION PARA AJUSTE CONCENTRACIONES FAGOS-----
KLL=LL+6
XCBP(5)=XCBP(5)*(1.+0.25*XPP(KLL))
-----FINAL CORRECCION-----
ANTP=ANT
87 ANTP=ANTP
IF (J.NE.1) GO TO 244
*****
PARA EL PRIMER PUNTO DE CADA LISIS SE REALIZA LA ITERACCION , DE
MINUTO EN MINUTO , CALCULANDO EL NUMERO DE BACTERIAS A CADA
TIEMPO EXPERIMENTAL
*****
CALL MAESTR(X,XCBP,TEP,TF,ANT,IFLAG,TEO)
ANTP=ANT
GO TO 247
244 CONTINUE
*****
INTERPOLACION PARA CALCULAR EL NUMERO DE BACTERIAS EN CADA PUNTO
POSTERIOR A LA INFECCION
*****
LSD=IDAT-1
DO 245 IN=1,LSD
INP=IN+1
245 IF (TEP.GT.(TEM(IN)-0.01).AND.TEP.LT.(TEM(INP)-0.01)) GO TO 246
IF (TEP.LE.(TEM(1)-0.01)) TEO=ALOG(BACT(1))
IF (TEP.LE.(TEM(1)-0.01)) GO TO 248
IF (TEP.GT.TEM(INP)) TEO=ALOG(BACT(INP))
IF (TEP.GT.TEM(INP)) TEO=ALOG(BACT(INP)+PDOM*VMEM(INP))
.....CORRECCION PARA CONSIDERAR LAS.....
.....MEMBRANAS EN LA DENSIDAD OPTICA.....
GO TO 248
246 TEO=ALOG(BACT(IN))
6 TEO=ALOG(BACT(IN)+PDOM*VMEM(IN))
.....FINAL CORRECCION.....
GO TO 248
247 IF (IFLAG.NE.3) GO TO 248
*****
SE LLENA LAS CURVAS TECRICAS QUE CORRESPONDEN
PF=NUMERO DE FAGOS
PE=EFICACIAS
PM=MEMBRANAS
PB=BACTERIAS
PT=TIEMPOS
*****
VFAG(1)=VFAG(2)
NST=C
IVFI=IDAT-MOD(IDAT,20)
ATV=FLOAT(IVFI)/20.
ATV=ATV+0.01
NTV=INT(ATV)+1
DO 75 IP=1,NTV
IN=20*(IP-1)
IF (IP.EQ.1) IN=1
NST=NST+1
IF (VFAG(IN).LT.100.) VFAG(IN)=100.
PF(NST,LL)=ALOG(VFAG(IN))

```

```

IF (BACT(IN).LT.100.) BACT(IN)=100.
PB(NST,LL)=ALOG(BACT(IN))
75 PT(NST,LL)=TEM(IN)
NUP(LL)=NST
248 CONTINUE
30 TECH(J,LL)=TEO
IF (J.EQ.1) GO TO 2:
*****
CALCULO DEL CHISQUARE
*****
IF (IFLAG.EQ.3) WRITE(6,1581) TEO,EX,EEXP,F
581 FORMAT(' CHIS ',4F10.4 )
F=F+ (EX-TEO)**2/EEXP**2
IF (IRES.NE.1) GO TO 21
IF (VFAG(IDAT).LT.100.) VFAG(IDAT)=100.
ATFAG(LL)=VFAG(IDAT)
TEOF(LL)=(ANFAG(LL)-ATFAG(LL))**2/ENFAG(LL)**2
F=F+FAEL*TEOF(LL)
IF (IFLAG.EQ.3) WRITE (6,5555) VFAG(IN),ATFAG(LL),TEOF(LL),F
555 FORMAT(' VFAG,ATFAG,TEOF,F ...' E10.3,3(1X,F10.5))
21 CONTINUE
FA=F
IF (IFLAG.EQ.3) WRITE(6,2236) NENTR,(XPP(M),M=1,3),F
236 FORMAT(1X,I9,3(1X,F10.5),1X,F20.5)
GO TO 211
24 F=FA*2.3
211 IF (IFLAG.NE.3) RETURN
DO 35 I=1,NEXP
K=N(I)+1
WRITE(6,300) (BN(J,I),TEOH(J,I),T(J,I),EBN(J,I),J=2,K)
300 FORMAT(4(7X,F10.3))
35 CONTINUE
DO 31 J=1,NEXP
LS=N(J)+1
DO 32 I=2,LS
IN=I-1
VE(IN)=BN(I,J)
EVE(IN)=EBN(I,J)*1.8
VT(IN)=TEOH(I,J)
32 VX(IN)=TN(I,J)
LPS=LS-1
*****
LAS LLAMADAS A MOMEN SON PARA REALIZAR DIGUJCS
*****
CALL MOMEN(VE,EVE,VT,VX,LPS)
NUPP=NUP(J)
NTV=NUPP
DO 76 I=1,NUPP
PFT(I)=PF(I,J)
PBT(I)=PB(I,J)
PMT(I)=PM(I,J)
PET(I)=PE(I,J)
76 TTT(I)=PT(I,J)
AUXP=PT(NUPP)
PFT(NUPP)=EXP(AUXP)
IDAT2=IDAT+200
274 FORMAT(1X,F10.5,7E8.3)
WRITE(6,275) PFT(NUPP)
31 CONTINUE
WRITE(6,274) ((TEM(I),BACT(I),FAGO(I),EFIG(I),VFAG(I),VMEM(I),

```

```

3  FORMAT(' EL NUMERO DE FAGOS EN EL ULTIMO PUNTO ES ',E8.3)
DO 156 I=1,IDAT2
IF(BACT(I).LT.10..OR.VFAG(I).LT.10.) GO TO 156
ABA=ALOG(BACT(I))
AFA=ALOG(VFAG(I))
TIM=TEM(I)
WRITE(5,157) TIM,ABA,AFA
7  FORMAT(3(5X,F10.4))
CONTINUE
WRITE(6,4722) ((ANFAG(I),ENFAG(I),ATFAG(I),TEOF(I)),I=1,NEXP)
22 FORMAT(' NUM.EXP FAGOS ERROR NUM.TEORICO FAGOS ERROR',
1(4(1X,E10.4)))
RETURN
END

```

```

FUNCTION IUROSA(V,VEC,N)
DIMENSION VEC(2)
*****
SUBROUTINA QUE NOS DA EN IUROSA EL NUMERO DE INTERVALO DE V EN EL
VECTOR DE VALORES VEC
*****
IUROSA=0
N1=N-1
DO 1 I=1,N1
J=I+1
IF(V.GE.VEC(I).AND.V.LT.VEC(J)) GO TO 2
1 CONTINUE
IF(V.GT.VEC(N)) IUROSA=N
GO TO 3
2 IUROSA=I
3 CONTINUE
RETURN
END

```

```

SUBROUTINE MAESTR(X,XCB,T,TI,ANT,IFLAG,TEO)
COMMON/TEMP/TT(5)
COMMON/EVOL/TEM(2000),BACT(2000),FAGO(2000),EFIG(2000),IDAT,
1VFAG(2000),VMEM(2000),AUX,POBAC(2000),PP1,PP2,BACS(2000),PP3
COMMON/LARA/ITTT(50)
COMMON/JUAN/ANFT

```



```

DIMENSION FTOAD(2000)
DATA JT/5./
DOUBLE PRECISION AU1,AU2,AU3,UUFAG
DOUBLE PRECISION AA,AU,UANT,IER1
XCB(1) ES EL COEFICIENTE LINEAL DEL EXPONENTE EN LA PRIMERA
PARTE DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO (MINUTOS**-2)
XCB(2) ES EL EXPONENTE DE LA PARTE LINEAL (MINUTOS **-1)
XCB(3) ES EL TIEMPO AL QUE ACABA LA ZONA EXPCNENCIAL
TDB ES EL TIEMPO DE DUPLICACION BACTERIAL
*****
BAPN SON LOS NUMEROS DE BACTERIAS EN LOS PUNTOS CLAVES DE LA
CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIAL
*****
TDB=XCB(2)
A1=XCB(1)
A2=XCB(2)
A3=XCB(3)
ANBAC=XCB(7)
BAPN(1)=0.
BAPN(2)=ANBAC+A1*TT(2)**2
BAPN(3)=BAPN(2)+A2*(TT(3)-TT(2))
BAPN(4)=BAPN(3)+A3*(TT(4)-TT(3))**2
BAPN(5)=BAPN(4)+10.
BAPN(4)=BAPN(3)+10.
DO 1 I=1,4
1 BAPN(I)=EXP(BAPN(I))
XCB(4) EL TIEMPO EN QUE YA NO HAY CRECIMIENTO BACTERIAL(MINUTOS)
XCB(5) ES LA CONCENTRACION INICIAL DE FAGOS
PF=X(1)
PF ES EL PARAMETRO QUE DEFINE EL CRECIMIENTO DE FAGOS
TC=TT(4)
C=XCB(5)
ANFO=ANT/X(6)

UTILIZAREMOS INTERVALOS DE UN MINUTO

N1=2000
TP=TI
PTD3=A2
UUFAGT=0.
ANME=0.
OLMEM=0.
ANMEP=0.
ANF=ANFO.
IDAT=0
EFICAC=0.999
CALL JZERO(FTOAD,1,2000)
*****
SE COMIENZA LA ITERACCION HASTA UN NUMERO MUY GRANDE DE PUNTOS
(N1=2000) O HASTA QUE EL TIEMPO TP SEA MAYOR QUE EL TIEMPO ,T,
DEL PUNTO EXPERIMENTAL REQUERIDO
*****
DO 3 I=1,N1
IDAT=IDAT+1
TP=TP+DT
TEM(IDAT)=TP
IF (I.EQ.1) GO TO 31
*****
LLAMADA A CALFAG PARA QUE DEVUELVA
DANF=NUMERO DE FAGOS PRODUCIDO EN EL INTERVALO I

```

```

*****
CALL CALFAG(X,DANF,DAME,UFAG,DBACT)
-----CUIDADO SE QUITO LAS MEMBRANAS-----
-----EN EL CALCULO DE LA EFICACIA-----
ANME=ANME+X(5)*DAME+OLMEM
ANMEP=ANMEP+DAME
GO TO 32
31 DANF=ANF
DBACT=0.
DAME=1.
UFAG=ANF
ANTC=ANT
32 CONTINUE
A=ANT+ANME
IF (UFAG.GT.1.) GO TO 51
EFICAC=1.
GO TO 52
51 CONTINUE
*****
CALCULO DE LA EFICACIA DE INFECCION-EFICAC-(NECESARIAMENTE HA DE
HACERSE EN DOBLE PRECISION)
*****
CORRECCION POR IMPOTENCIA
UPFAG=DBACT*X(6)
UUFAG=UPFAG
AA=A
AU=1.
AU1=AA-AU
AU2=A
AU3=(AU1/AU2)**UPFAG
UANT=ANT
TER1=(AU-AU3)*UANT/UUFAG
EFICAC=TER1
CORRECCION POR IMPOTENCIA
EFICAC=EFICAC*X(6)
52 CONTINUE
*****
SE LLENAN LOS VECTORES BACT,FAGO,EFIG,UFAG Y VMEM
*****
BACT(IDAT)=ANTC
VMEM(IDAT)=ANMEP
BACS(IDAT)=ANT
FAGO(IDAT)=DANF
FTOAD(IDAT)=DANF
IND=IDAT-1
CAUXIT=0.
IF (IND.LT.1) GO TO 2004
DO 2002 LP=1,IND
CAUXI=X(2)*DT*FTOAD(LP)*(BACT(IDAT)+X(5)*VMEM(IDAT))**.333
IF (FTOAD(LP).LT.CAUXI) GO TO 2003
FTOAD(LP)=FTOAD(LP)-CAUXI
CAUXIT=CAUXIT+CAUXI*(1.-EFICAC)
GO TO 2002
2003 CAUXIT=CAUXIT+FTOAD(LP)*(1.-EFICAC)
FTOAD(LP)=0.
2002 CONTINUE
2004 CONTINUE
UFAGT=UFAGT+CAUXIT
EFIG(IDAT)=EFICAC
VFAG(IDAT)=UFAG+DANF+UFAGT

```

\*\*\*\*\*  
 SE DETERMINA LA ZONA DE CRECIMIENTO BACTERIAL CON OBJETO DE  
 CALCULAR EL INCREMENTO DE BACTERIAS CORRESPONDIENTE AL INTERVALO I  
 \*\*\*\*\*

IF (ANT.LE.5.) GO TO 13

MM=IUROSA (ANT,BAPN,4)

IF (MM.LT.2) WRITE (6,1782)

782 FORMAT ( ' OJO CALCULAMOS CON TIEMPOS DE INFECCION < Z.L.' )

IF (MM.EQ.2) GO TO 4

IF (MM.EQ.3) GO TO 11

IF (MM.GT.3) GO TO 13

AA=ALOG(ANT)-ANBAC

IF (AA.LT.0.) AA=0.

PTDBP=2.\*SQRT(AA\*A1)

GO TO 4

11 CONTINUE

AA=A3\*(TT(4)-TT(3))\*2+A2\*(TT(3)-TT(2))+A1\*TT(2)\*\*2+ANBAC-ALOG(ANT

1)

IF (AA.LT.0.) WRITE (6,55),AA

IF (AA.LT.0.) AA=0.

55 FORMAT (F13.5)

PTDBP=2.\*SQRT(AA\*A3)

PA1=ALOG(ANT)-ALOG(BAPN(3))

PA2=XCB(4)\*PA1

PA3=XCB(2)-PA2

DELN=PA3\*DT

IF (DELN.LT.0.) WRITE (6,221) PA1,PA2,PA3,DELN

221 FORMAT (4(1X,F10.5))

IF (DELN.LT.0.) GO TO 10

DELNN=ANT\*DELN

ANT=ANT+DELNN

ANTC=ANTC+DELNN

GO TO 13

4 CONTINUE

PTDB=>PTDBP

IF (MM.EQ.2) PTDB=PTDB

\*\*\*\*\*

SE INCREMENTA Y DECREENTA EL NUMERO DE BACTERIAS (ANT) CON EL  
 CRECIMIENTO Y LA DESAPARICION POR INFECCION Y SE CALCULA EL  
 NUMERO DE FAGOS LIBRES ACUMULADO (ANFT)

\*\*\*\*\*

ANT=ANT+ANT\*PTDB\*DT

ANTC=ANTC+ANT\*PTDB\*DT

10 ANT=ANT-DBACT\*EFICAC

TAUX=TEM(IDAT)-X(1)

NAUX=IUROSA(TAUX,TEM,IDAT)

OLMEM=OLMEM+PDBAC(IDAT)

IF (NAUX.EQ.0.OR.NAUX.EQ.IDAT) GO TO 61

OLMEM=OLMEM-PDBAC(NAUX)

ANTC=ANTC-PDBAC(NAUX)

61 CONTINUE

CORRECCION PARA CONSIDERAR LOS FAGOS DESPRENCIDOS

TERN=ANFT\*X(6)\*DT

TERN=ANFT\*X(6)

FAGO(I)=FAGO(I)+TERN PARA DESPEGUE DE FAGOS

IF (T.LT.TP) GO TO 7

IF (ANTC.LT.1.) GO TO 7

IF (ANT.LE.5.) ANT=4.5

3 CONTINUE

WRITE (6,800)



DOUBLE PRECISION S

```
ISW = IER
IER = 0
IF (N-2) 1,2,3
1 IEP = 1
2 LN = 1
X(1) = 2.886751E-1
W(1) = 0.500
GOTO 25
3 IF (N-4) 4,5,6
4 IER = 2
5 LN = 2
X(1) = 4.335682E-1
X(2) = 1.699905E-1
W(1) = 1.73927422568726930-1
W(2) = 3.26072577431273070-1
GOTO 25
6 IF (N-8) 7,8,9
7 IER = 2
8 LN = 4
X(1) = 4.801449E-1
X(2) = 3.983332E-1
X(3) = 2.627662E-1
X(4) = 9.171732E-2
W(1) = 5.06142681451881300-2
W(2) = 1.11190517226687240-1
W(3) = 1.56853322938943640-1
W(4) = 1.81341891689180990-1
GOTO 25
9 IF (N-12) 10,11,12
10 IER = 2
11 LN = 6
X(1) = 4.907803E-1
X(2) = 4.520586E-1
X(3) = 3.849513E-1
X(4) = 2.936590E-1
X(5) = 1.839157E-1
X(6) = 6.261670E-2
W(1) = 2.35876681932559140-2
W(2) = 5.34696629976592150-2
W(3) = 8.0039164271673110-02
W(4) = 1.01583713361532960-1
W(5) = 1.16746268269177400-1
W(6) = 1.24573522906701390-1
GOTO 25
12 IF (N-16) 13,14,15
13 IER = 2
14 LN = 8
X(1) = 4.947005E-1
X(2) = 4.722875E-1
X(3) = 4.328156E-1
X(4) = 3.777022E-1
X(5) = 3.089381E-1
X(6) = 2.290084E-1
X(7) = 1.408018E-1
X(8) = 4.750625E-2
W(1) = 1.35762297058770470-2
W(2) = 3.11267619693239460-2
W(3) = 4.75792558412463920-2
W(4) = 6.23144856277609360-2
W(5) = 7.4797994408288370-02
```

```

15 IF (N=24) 16,17,18
16 IER =2
17 LN =12
  X(1) =4.975936E-1
  X(2) =4.873643E-1
  X(3) =4.691373E-1
  X(4) =4.432178E-1
  X(5) =4.130015E-1
  X(6) =3.730621E-1
  X(7) =3.247468E-1
  X(8) =2.727107E-1
  X(9) =2.168968E-1
  X(10)=1.575213E-1
  X(11)=9.555943E-2
  X(12)=3.202845E-2
  W(1) =6.17061489999359980-3
  W(2) =1.42656943144668320-2
  W(3) =2.21387194087099030-2
  W(4) =2.96492924577183900-2
  W(5) =3.66732407055401530-2
  W(6) =4.30950807659766380-2
  W(7) =4.88093260520569440-2
  W(8) =5.37221350579829170-2
  W(9) =5.77528340268628010-2
  W(10)=6.08352364639016960-2
  W(11)=6.29187281734141480-2
  W(12)=6.39690976733760780-2
  GO TO 25

```

```

18 IF (N=32) 19,20,21
19 IER =2
20 LN =16
  X(1) =4.986319E-1
  X(2) =4.928058E-1
  X(3) =4.823811E-1
  X(4) =4.674530E-1
  X(5) =4.481606E-1
  X(6) =4.246838E-1
  X(7) =3.972419E-1
  X(8) =3.660911E-1
  X(9) =3.315221E-1
  X(10)=2.938579E-1
  X(11)=2.534500E-1
  X(12)=2.106756E-1
  X(13)=1.659343E-1
  X(14)=1.196437E-1
  X(15)=7.223598E-2
  X(16)=2.415383E-2
  W(1) =3.50930500473504830-3
  W(2) =8.1371973654528350-03
  W(3) =1.25960326546310300-2
  W(4) =1.71369314565107170-2
  W(5) =2.14179490111133400-2
  W(6) =2.54990296311880880-2
  W(7) =2.93420467392677740-2
  W(8) =3.29111113881809230-2
  W(9) =3.61728970544242530-2
  W(10)=3.90969478935351530-2
  W(11)=4.16559621134733780-2
  W(12)=4.38260465022019060-2
  W(13)=4.55869393478819420-2

```

```

GO TO 25
21 IF (N-48) 22,24,23
22 IER =2
   GOTO 24
23 IER =3
24 LN =24
   X(1) =4.993855E-1
   X(2) =4.967651E-1
   X(3) =4.920623E-1
   X(4) =4.852958E-1
   X(5) =4.764939E-1
   X(6) =4.656933E-1
   X(7) =4.529396E-1
   X(8) =4.382860E-1
   X(9) =4.217941E-1
   X(10)=4.035331E-1
   X(11)=3.835795E-1
   X(12)=3.620171E-1
   X(13)=3.389362E-1
   X(14)=3.144337E-1
   X(15)=2.886124E-1
   X(16)=2.615805E-1
   X(17)=2.334515E-1
   X(18)=2.043432E-1
   X(19)=1.743779E-1
   X(20)=1.436812E-1
   X(21)=1.123819E-1
   X(22)=8.061118E-2
   X(23)=4.850235E-2
   X(24)=1.619009E-2
   W(1) =1.5766730261529190-3
   W(2) =3.6637769506381310-3
   W(3) =5.7386172896172700-3
   W(4) =7.7896578614719240-3
   W(5) =9.8080802286777640-3
   W(6) =1.1785380419662190-2
   W(7) =1.3713254854178470-2
   W(8) =1.5583613916399040-2
   W(9) =1.7388611282385220-2
   W(10)=1.9120675532915350-2
   W(11)=2.0772541471732370-2
   W(12)=2.2337280428347140-2
   W(13)=2.3808329246245240-2
   W(14)=2.5179517776927240-2
   W(15)=2.6445094742596830-2
   W(16)=2.7599751849992080-2
   W(17)=2.8638646050201610-2
   W(18)=2.9557419849197820-2
   W(19)=3.0352219582946940-2
   W(20)=3.1019711579946330-2
   W(21)=3.1557096143127010-2
   W(22)=3.1962119292324090-2
   W(23)=3.2233082217975040-2
   W(24)=3.2368848406341960-2
25 A   =(XL+XU)*.5
   B   =XU-XL
   S   =0.00
   DO 26 I=1,LN
       C   =B*X(I)
26   S   =S+(F(A+C)+F(A-C))*W(I)
   Y   =B*S
29 RETURN

```

```

FUNCTION F1BAC(T)
COMMON/EVOL/TEM(2000),BACT(2000),FAGO(2000),EFIG(2000),IDAT,
1VFAG(2000),VMEM(2000),AUX,PDBAC(2000),PP1,PP2,PP3
COMMON/TIRED/DT,IFH
LS=IDAT-1
F1BAC=0.
IF(T.GT.TEM(2)) GO TO 3
I1=1
I2=1
GO TO 4
3 CONTINUE
IF(T.GT.TEM(LS)) GO TO 5
DO 1 I=1,LS
IF(T.LE.TEM(I)) GO TO 2
1 CONTINUE
I=IDAT-1
2 I2=I
I1=I2-1
GO TO 4
5 I1=LS
I2=LS
4 CONTINUE
FN1=FAGO(I1)
FN2=FAGO(I2)
IF(I1.EQ.I2) GO TO 6
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*BACT(I1)**0.333) **J.A.**
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*(BACT(I1)+PP3*VMEM(I1))**0.333)
6 CONTINUE
DO 7 J=I2,LS
IF(FN1.LT.5.) GO TO 8
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*BACT(J)**0.333) **J.A.**
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*(BACT(J)+PP3*VMEM(J))**0.333)
8 IF(FN2.LT.5.) GO TO 7
FN2=FN2*(1.-PP2*DT*BACT(J)**0.333) **J.A.**
FN2=FN2*(1.-PP2*DT*(BACT(J)+PP3*VMEM(J))**0.333)
7 CONTINUE
IF(I1.EQ.I2) GO TO 60
F1BAC=(FN1-FN2)*T+FN2*TEM(I1)-FN1*TEM(I2)
F1BAC=-F1BAC/DT
GO TO 61
60 F1BAC=FN1
61 CONTINUE

100 FORMAT('ESCRITURA 2',2(1X,I20),1X,F10.5,
17(1X,E10.3))
RETURN
END

```



```

FUNCTION F2BAC(T)
COMMON /EVOL/TEM(2000),BACT(2000),FAGO(2000),EFIG(2000),IDAT,
1 V FAG(2000),VMEM(2000),AUX,PDBAC(2000),PP1,PP2,PP3
COMMON /TIRED/DT,IFH
F2BAC=0.
LS=IDAT-1
IF(T.GT.TEM(2)) GO TO 3
I1=1
I2=1
GO TO 4
3 CONTINUE
IF(T.GT.TEM(LS)) GO TO 5
DO 1 I=1,LS
IF(T.LE.TEM(I)) GO TO 2
1 CONTINUE
I=I; AT-1
2 I2=I
I1=I2-1
GO TO 4
5 I1=LS
I2=LS
4 CONTINUE
WRITE(6,200) I1,I2,T,PP1,DEL1,DEL2,BACT(I1),BACT(I2)
200 FORMAT(2(1X,I10),4(1X,F10.5),2(1X,E8.3))
LS=IFH
FN1=FAGO(I1)
FN2=FAGO(I2)
IF(I1.EQ.I2) GO TO 6
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*BACT(I1)**0.333) **J.A.**
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*(BACT(I1)+PP3*VMEM(I1))**0.333)
6 CONTINUE
DO 7 J=I2,LS
IF(FN1.LT.5.) GO TO 8
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*BACT(J)**0.333) **J.A.**
FN1=FN1*(1.-PP2*DT*(BACT(J)+PP3*VMEM(J))**0.333)
8 IF(FN2.LT.5.) GO TO 7
FN2=FN2*(1.-PP2*DT*BACT(J)**0.333) **J.A.**
FN2=FN2*(1.-PP2*DT*(BACT(J)+PP3*VMEM(J))**0.333)
7 CONTINUE
IF(I1.EQ.I2) GO TO 60
F2BAC=(FN1-FN2)*T+FN2*TEM(I1)-FN1*TEM(I2)
F2BAC=-F2BAC/DT
GO TO 61
60 F2BAC=FN1
61 CONTINUE
WRITE(6,200) I1,I2,T,V1,V2,VINT1,VINT2,A,B,F2BAC
100 FORMAT(' ESCRITURA 3',2(1X,I10),1X,F10.5,
17(1X,E10.3))
62 RETURN
END

```

- 1 - Afinogenova, A.V., Ratner, E.V. and Lambina, V.A. (1978) *Mikrobiologiya* 47, 265
- 2 - Blobel, G. and Dobberstein, D. (1975) *J. Cell. Biol.* 57, 835-851
- 3 - Bode, V.C. and Kaiser, A.D. (1965a) *J. Mol. Biol.* 14, 399-417
- 4 - Boklage, C.E., Wonet, E.C.T., Bode, V.C. (1973) *Genetics* 75, 221-230
- 5 - Buchwald, M., Steed-Gaister, P. and Siminobitch, L. (1970a) *Virology* 42, 375-389
- 6 - Buchwald, M., Steed-Gaister, P. and Siminovitch, L. (1970b) *Virology* 42, 390-400
- 7 - Campbell, A. (1961) *Evolution* 15, 153
- 8 - Campbell, A. and Del Campillo-Campbell (1963) *J. Bacteriol.* 85, 1202-1207
- 9 - Campbell, A. (1971) ed. A.D. Hershey. Cold Spring Harbor Laboratory, New York pp. 13-44
- 10 - Campbell, J.H. and Rolfe, B.G. (1975) *Molec. Gen. Genet.* 139, 1-8
- 11 - Caperon, J. (1969) *Ecology* 50, 188
- 12 - Chadwick et al. (1970) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 283-294
- 13 - Chao, L., Levin, B.R. and Stewart, F.M. (1977) *Ecology* 58, 369
- 14 - Crowley, P.H., Straley, S.C., Graig, R.J., Culins, J.D., Fu, Y.T., Hayden, T.L., Robinson, T.A., Straley, J.P. (1980) *J. Theor. Biol.* 86, 377-400
- 15 - Daniels, D.L., Dewet, J.R., and Blattner, F.R. (1980), *J. Virol.* 33, 390-400
- 16 - De Vidania, R., Garcés, F., Dávila, C.A. (1979) *Inf. J.E.N.* (nº 437)
- 17 - Dove, W. (1966) *J. Mol. Biol.* 19, 187-201
- 18 - Echols, H. and Muriald, H. (1978) *Microbiol. Rev.* 42, 577-591

- Pereira de Silva, L. and Jacob, F. (1966) Virology 30, 224-241
- 20 - Eiserling, F.A. and Boy de la Tour, E. (1965) Path. Microbiol. 28, 175-188
- 21 - Ellis, E.L. and Delbruck, M. (1939) J. Gen. Physiol. 22, 365-384
- 22 - Fangman, W.L. and Feiss, M. (1969) J. Mol. Biol. 44, 103-116
- 23 - Habte, M. and Alexander, M. (1978) Ecology 59, 140
- 24 - Harris, A.W., Mount, D.W.A., Fuerst, C.R., Siminovitch, L. (1967) Virology 32, 553-569
- 25 - Harrison, D.P., Brown, D.T. and Bode, V.C. (1973) J. Mol. Biol. 79 437-450
- 26 - Hedgreth, J., Clement, J.H., Marchal, C., Perrin, D. and Hofung, M. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 2621-2625
- 27 - Herbert, D., Elsworth and Telling, R.C. (1956) J. Gen. Microbiol. 14, 601-622
- 28 - Jacob, F., Fuerst, C.R. and Wollman, E.L. (1957) Ann. Inst. Pasteur 93, 724-745
- 29 - Jacob, F. and Campbell, A. (1959) C.r.hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris 248, 3219
- 30 - Jacob, F. and Monod, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 318-356
- 31 - Jacob, F., Sussman, R. and Monod, J. (1962) Comp. Rend. Acad. Sci. Paris, 254, 4214-4216
- 32 - James, F. (1976) Program MINUIT. Long write-up. TC program library. CERN
- 33 - Joyner, A., Isaacs, L.N., Echols, H. and Sly, W.S. (1966) J. Mol. Biol. 19, 174-186
- 34 - Kaiser, A.D. (1957) Virology 3, 42
- 35 - Kaiser, A.D. and Jacob, F. (1957) Virology, 4, 509-521
- 36 - Kaiser, D., Syvarren, M. and Masuda, T. (1957) J. Mol. Biol. 91, 175-186
- 37 - Karamata, D., Kellenberger, E., Kellenberger, G. and Terzi, M. (1962) Pathol. Microbiol. 25, 575-585

- 39 - Kellenberger, E. and Edgar, R.S. (1971) In the Bacteriophage Lambda ed. A.D. Hershey (Cold. Spring Harbor Laboratory, New York) pp. 271-295
- 40 - Kemp, C.L., Howatson, A.F. and Siminobitch, L. (1968) Virology 36, 490-502
- 41 - Lieb, M. (1966) J. Mol. Biol. 16, 149-163
- 42 - Mackay, D.J. and Bode, V.C. (1976a) Virology 72, 154-166
- 43 - Mackay, D.J. and Bode, V.C. (1976b) Virology 72, 167-181
- 44 - Marchal, C., Perrin, D., Hedgpeth, J. and Hofnung, M. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 1491-1495
- 45 - Mc Macken, R., Kessler, S. and Boyce, R. (1975) Virology 66, 356-371
- 46 - Monod, J. (1950), Ann. Inst. Pasteur 79, 390
- 47 - Mount, D.W.A., Harris, A.W., Fuerst, C.R. and Siminovitch, L. (1968) Virology 35, 749-754
- 48 - Murialdo, H. and Siminovitch, L. (1972) Virology 48, 824-835
- 49 - Ogawa, H. and Tomizawa, J. (1967) J. Mol. Biol. 23, 265-276
- 50 - Ordal, G.W. and Kaiser, A.D. (1973) J. Mol. Biol. 79, 709-722
- 51 - Parkinson, J.S. (1968) Genetics 59, 311-325
- 52 - Ptashme, M. (1967a) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 306
- 53 - Ptashme, M. (1967b) Nature, Lond. 214, 232
- 54 - Ptashme, M. and Hopkins, N. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 1282-1287
- 55 - Randall-Hazelbaner, L. and Schwartz, M. (1973) J. Bacteriol. 116, 1436-1446
- 56 - Randall, LL., Hardy, S.J.S. and Josefson, L.G. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1209-1212
- 57 - Ray, P. and Murialdo, H. (1975) Virology 64, 247-263
- 58 - Reader, R.W., Siminovitch, L. (1971a) Virology 43, 607-622
- 59 - Reader, R.W., Siminovitch, L. (1971b) Virology 43, 623-637

- 60 - Roa, M. and Scandella, D. (1976) Virology 72, 182-194
- 61 - Scandella, D. and Arber, W. (1974) Virology 58, 504-513
- 62 - Scandella, D. and Arber, W. (1976) Virology 59, 206-215
- 63 - Scott, D. ELM and Silhaby, T.J. (1980) J. Mol. Biol. 141, 63-90
- 64 - Shlesinger, M (1932) Reprinted (1965) in Papers on Bacterial Viruses (Stant G.S. ed.) Little, Brown and Co., Boston
- 65 - Schwartz, M. (1975) J. Mol. Biol. 99, 185-202
- 66 - Sussman, R. and Jacob, F. (1962) C.r. hebdom. Seanc. Acad. Sci. Paris, 254, 1517
- 67 - Szybalski, E.H. and Szubalski, W. (1979) Gene. 42, 217
- 68 - Taylor, A. (1971) Nature New Biol. 234, 144-155
- 69 - Thirion, J.P. and Hofnung, M. (1972) Genetics 71, 207-216
- 70 - Titman, D. (1976) Science 192, 463
- 71 - Tomizawa, J.I. (1971) In the Bacteriophage Lambda, ed. A.D. Hersey (Cold Spring Harbor Laboratory: New York) pp. 549-522
- 72 - Van den Ende, P. (1973) Science 181, 562
- 73 - Varon, M. and Zeigler, B.P. (1978) Appl. Envir. Microbiol. 36, 11
- 74 - Weidel, W., Frank, H. and Martin, H.H. (1960) J. Gen. Microbiol. 22 156-158
- 75 - Weigle, J. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1462-1466